

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 888**

51 Int. Cl.:  
**C12P 13/12** (2006.01)  
**C12N 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03732449 .8**  
96 Fecha de presentación: **23.05.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1516059**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.03.2005**

54 Título: **Procedimiento para la producción por fermentación de productos químicos finos que contienen azufre**

30 Prioridad:  
**23.05.2002 DE 10222858**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.06.2012**

73 Titular/es:  
**EVONIK DEGUSSA GMBH  
RELLINGHAUSER STRASSE 1-11  
45128 ESSEN, DE**

72 Inventor/es:  
**SCHRÖDER, Hartwig;  
KRÖGER, Burkhard;  
ZELDER, Oskar;  
KLOPPROGGE, Corinna y  
HÄFNER, Stefan**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 383 888 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 por fermentación de productos químicos finos que contienen azufre

5 Es objeto del invento un nuevo procedimiento para la producción por fermentación de L-metionina, en cuyo caso se aprovechan unas bacterias, en las que se expresan unas secuencias de nucleótidos, que codifican mutantes de la S-adenosil-metionina sintasa (metK) (E.C.2.5.1.6); unas secuencias de nucleótidos, que codifican estos mutantes, así como los microorganismos recombinantes transformados con éstos, así como nuevos mutantes de la metK con una actividad enzimática modificada.

10

Estado de la técnica

15 Unos productos químicos finos que contienen azufre, tales como, por ejemplo, metionina, homocisteína, S-adenosil-metionina, glutatión, cisteína, biotina, tiamina y ácido lipónico, se producen en células por medio de procesos metabólicos naturales, y se utilizan en muchos ramales industriales, inclusive las industrias alimentaria, de piensos, cosmética y farmacéutica. Estas sustancias, que son designadas en común como "productos químicos finos que contienen azufre", abarcan ácidos orgánicos, aminoácidos tanto proteinógenos como también no proteinógenos, vitaminas y cofactores. Su producción se efectúa de la manera más conveniente a gran escala mediante cultivación de unas bacterias, que habían sido desarrolladas para producir y segregar grandes cantidades de la sustancia deseada en cada caso. Unos organismos especialmente adecuados para esta finalidad son las bacterias corineformes gram positivas, no patógenas.

20

25 Es conocido el hecho de que ciertos aminoácidos pueden ser producidos por fermentación de cepas de bacterias corineformes, en particular de *Corynebacterium glutamicum*. A causa de la gran importancia de esto, se está trabajando constantemente en el mejoramiento de los procedimientos de producción. Ciertos mejoramientos de los procedimientos pueden implicar a medidas técnicas de fermentación, tales como por ejemplo las de agitación y abastecimiento con oxígeno, o a la composición de los medios nutritivos, tal como por ejemplo la concentración de azúcares durante la fermentación, o al tratamiento para dar el producto, por ejemplo mediante una cromatografía con intercambio de iones, o a las propiedades intrínsecas de rendimiento del microorganismo propiamente dicho.

30

35 A través de una selección de cepas se han desarrollado una serie de cepas mutantes, que producen una gama de compuestos deseables escogidos entre la serie de los productos químicos finos que contienen azufre. Para el mejoramiento de las propiedades de rendimiento de estos microorganismos en lo que respecta a la producción de una determinada molécula, se utilizan métodos de mutagénesis, selección y elección de mutantes. No obstante, esto constituye un procedimiento largo, tedioso y difícil. de esta manera se obtienen p.ej. unas cepas, que son resistentes frente a ciertos antimetabolitos, tales como p.ej. los compuestos análogos a metionina  $\alpha$ -metil-metionina, etionina, norleucina, N-acetil-norleucina, S-trifluorometil-homocisteína, ácido 2-amino-5-hepteno-carboxílico, seleno-metionina, metionina-sulfoximina, metoxina, ácido 1-amino-ciclopentano-carboxílico, o que son auxótrofas para ciertos metabolitos importantes para regulación, y producen productos químicos finos que contienen azufre, tales como p.ej. L-metionina.

40

45 Desde hace algunos años se están empleando asimismo unos métodos de la técnica de ADN recombinante para el mejoramiento de las cepas, particularmente de cepas de *Corynebacterium* que producen L-aminoácidos, amplificando genes individuales para la biosíntesis de aminoácidos e investigando la repercusión sobre la producción de aminoácidos.

50

55 A partir del documento de solicitud de patente japonesa JP-A-06-020809 se conoce una secuencia de nucleótidos para un gen que codifica S-adenosil-metionina procedente de *Brevibacterium flavum* MJ-233, que es una bacteria corineforme. La correspondiente secuencia de aminoácidos abarca 412 aminoácidos. La proteína tiene, entre otros lugares en las posiciones 24 y 94, en cada caso sendos restos de cisteína, que están conservados en las correspondientes enzimas de otras numerosas bacterias corineformes. La secuencia divulgada de aminoácidos posee un segmento de secuencia característico entre los radicales 137 y 154. La producción de mutantes y la utilización de éstos en el caso la producción por fermentación de productos químicos finos que contienen azufre, no se describen allí.

60

65 A partir del documento de solicitud de patente internacional WO-A-01/00843 se conoce un gen metK procedente de *C. glutamicum*, que codifica una proteína con 407 aminoácidos y tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:16.

Ciertos mejoramientos de la producción por fermentación de productos químicos finos se correlacionan por regla general con ciertos mejoramientos de los flujos de sustancias y de los rendimientos. En este contexto es importante impedir o disminuir unas inhibiciones por productos intermedios o finales de importantes enzimas de síntesis. Asimismo, es ventajoso impedir o disminuir fugas del flujo de carbono en productos indeseados o en productos secundarios.

65

Puede ser investigada la influencia de ciertos metabolitos del metabolismo sobre las actividades enzimáticas de enzimas del metabolismo. Ejemplos de tales enzimas pueden ser metA, metB, metC, MetY, metH, metE, metF y otras enzimas que participan en el metabolismo de microorganismos. Un importante producto del metabolismo de la metionina y, por consiguiente, una esencial fuga, es la S-adenosil-metionina.

Al mismo tiempo, la S-adenosil-metionina es, no obstante, también una sustancia reguladora decisiva de la biosíntesis de metionina. Por ejemplo, se conoce el hecho de que la biosíntesis de L-metionina en *E. coli* es inhibida por la S-adenosil-metionina. La S-adenosil-metionina actúa allí como un co-represor del represor metJ (Weissbach, H. Brot, N. (1991) *Mol Microbiol.* 5 (7), 1593-1597).

La síntesis de la S-adenosil-metionina constituye al mismo tiempo una fuga esencial del producto valioso deseado L-metionina. Por lo tanto, por varios motivos, es deseable disminuir la cantidad de la S-adenosil-metionina formada:

- a) se aumentaría la cantidad de la L-metionina formada,
- b) se disminuiría la represión de genes de la biosíntesis de metionina y
- c) se disminuiría la inhibición por retroalimentación (feedback) de enzimas de la biosíntesis de metionina.

La supresión (delección) del gen metK sería la vía más sencilla para impedir la formación de S-adenosil-metionina. En la cita de Wei, Y. y Newman, E. B. (2002) *Mol. Microbiol.* 43 (6), 1651-1656, el metK ha sido descrito, sin embargo, como un gen esencial y parece descartarse por consiguiente para un experto en la especialidad como un punto de partida para realizar una mejorada producción por fermentación de productos químicos finos que contienen azufre, en particular de L-metionina.

GROSSMANN K Y COLABORADORES: en "Rapid cloning of metK encoding methionine adenosyltransferase from *Corynebacterium glutamicum* by screening a genomic library on a high density colony-array" [Clonación rápida de metK, que codifica la metionina adenosil transferasa de *Corynebacterium glutamicum*, mediante escrutinio de una biblioteca de genes en un conjunto de colonias de alta densidad], *FEMS MICROBIOLOGY LETTERS*, tomo 193, n° 1, 1 de diciembre de 2000, páginas 99-103, divulgan tanto la secuencia de nucleótidos codificadora de metK procedente de *Corynebacterium glutamicum*, como también la expresión de la misma en *C. glutamicum*. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos no codifica un polipéptido con una actividad disminuida de metK.

RECZKOWSKI R S Y COLABORADORES: en "Structural and functional roles of cysteine 90 and cysteine 240 in S-adenosylmethionine synthetase" [Cometidos estructurales y funcionales de la cisteína 90 y de la cisteína 240 en la S-adenosil-metionina sintasa], *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, tomo 270, n° 31, 4 de agosto de 1995, páginas 18484-18490, describen unos mutantes de metK con una actividad disminuida de metK, en las que la Cys90, perteneciente a la secuencia parcial de aminoácidos GFDANSCA de metK de *Escherichia coli*, ha sido reemplazada por Ala o Ser, al igual que para unos polinucleótidos y unas construcciones artificiales de expresión que codifican C90A/S-MetK.

KASE H Y COLABORADORES: en "Isolation and characterization of S-adenosylmethionine-requiring mutants and role of S-adenosylmethionine in the regulation of methionine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*" [Aislamiento y caracterización de mutantes que requieren S-adenosil-metionina y cometido de la S-adenosil-metionina en la regulación de la biosíntesis de metionina en *Corynebacterium glutamicum*], *AGR. BIOL. CHEM.*, tomo 39, n° 1, 1975, páginas 161-168, describen un procedimiento para la producción aumentada por fermentación de L-metionina, que está caracterizado por la fermentación de un mutante de *C. glutamicum* con una actividad disminuida de S-adenosil-metionina sintasa.

#### Breve descripción del invento

El invento está basado, por lo tanto, en la misión de poner a disposición un nuevo procedimiento para la producción por fermentación de L-metionina y los medios requeridos para ello.

El problema planteado por la misión arriba mencionada es resuelto de manera sorprendente mediante la puesta a disposición de un procedimiento para la producción por fermentación de L-metionina, que comprende la expresión de una secuencia de nucleótidos de metK en una bacteria corineforme, codificando la secuencia de nucleótidos un mutante de la S-adenosil-metionina sintasa, cuya actividad se ha disminuido frente a la de la enzima de tipo silvestre. Por ejemplo, el mutante se deriva de la S-adenosil-metionina sintasa procedente de *Corynebacterium glutamicum* y muestra, medida en *Corynebacterium glutamicum*, una actividad más pequeña que la de la enzima de tipo silvestre.

Un primer objeto del invento se refiere a un procedimiento para la producción por fermentación de L-metionina, que comprende las siguientes etapas:

- a) fermentación de un cultivo de bacterias corineformes, que produce L-metionina, siendo expresada en las bacterias corineformes por lo menos una secuencia de nucleótidos, que codifica una proteína con una actividad disminuida de adenosil-metionina sintasa (metK);

- b) enriquecimiento del producto químico fino que contiene azufre en el medio y/o en las células de las bacterias, y
- c) aislamiento del producto químico fino que contiene azufre, que comprende de manera preferida L-metionina.

De acuerdo con una forma preferida de realización, la bacteria corineforme mutada posee además una actividad de metY mejorada en comparación con la de la enzima de tipo silvestre no mutada, y/o una cantidad aumentada de L-metionina (p.ej. en g/l del caldo de fermentación).

En el procedimiento conforme al invento, como secuencia codificadora de metK se utiliza en particular una secuencia codificada de nucleótidos, que codifica una proteína con una actividad disminuida de metK, en la que se ha reemplazado por lo menos un resto de cisteína de la proteína de tipo silvestre.

La secuencia codificadora de metK, codifica una proteína con actividad de metK, que tiene la siguiente secuencia parcial de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:23:

**G (F/Y) (D/S) X<sup>1</sup>X<sup>2</sup> (S/T) X<sup>3</sup> (G/A) V**

en la que

X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan independientemente entre sí un aminoácido arbitrario; y  
X<sup>3</sup> representa un aminoácido distinto de Cys.

Se prefiere especialmente un procedimiento de acuerdo con la definición dada más arriba, en cuyo caso la secuencia codificadora de metK codifica una proteína con actividad de metK, abarcando la proteína una secuencia de aminoácidos de desde Met1 hasta Ala407 de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 o una secuencia de aminoácidos homóloga con respecto a ésta, que representa una proteína con una equivalencia funcional.

La secuencia codificadora de metK, empleada conforme al invento, abarca de manera preferida

una secuencia codificadora de acuerdo con la SEQ ID NO: 21 o una secuencia de nucleótidos homóloga con respecto a ésta, que codifica una proteína con actividad de metK.

La secuencia codificadora de metK es un ADN o un ARN replicable en bacterias corineformes o integrado de manera estable en el cromosoma.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el procedimiento conforme al invento se lleva a cabo

- a) empleando una cepa de bacterias transformada con un vector plasmídico, que lleva por lo menos una copia de la secuencia codificadora de metK bajo el control de unas secuencias reguladoras, o
- b) empleando una cepa, en la que se había integrado la secuencia codificadora de metK en el cromosoma de la bacteria.

Se prefieren especialmente unas cepas con la definición arriba mencionada, en las que adicionalmente se había eliminado total o parcialmente la actividad de la enzima metK de tipo silvestre, tal como p.ej. mediante supresión (deleción) de la secuencia codificadora de la enzima de tipo silvestre.

Además puede ser deseable fermentar unas bacterias, en las que adicionalmente se ha reforzado por lo menos otro gen de la ruta de biosíntesis del deseado producto químico fino que contiene azufre; y/o en las que se ha desconectado por lo menos parcialmente una ruta metabólica, que disminuye la formación de L-metionina.

De acuerdo con otra forma de realización del procedimiento conforme al invento, se fermentan por lo tanto unas bacterias corineformes, en las que se ha sobreexpresado al mismo tiempo por lo menos uno de los genes, que se escogen entre

- 1) el gen lysC, que codifica una aspartato cinasa,
- 2) el gen asd, que codifica una asparato-semialdehído deshidrogenasa,
- 3) el gen gap, que codifica la glicerolaldehído-3-fosfato deshidrogenasa,
- 4) el gen pgk, que codifica la 3-fosfoglicerato cinasa,
- 5) el gen pyc, que codifica la piruvato carboxilasa,
- 6) el gen tpi, que codifica la triosafofosfato isomerasa,
- 7) el gen metA, que codifica la homoserina O-acetiltransferasa,
- 8) el gen metB, que codifica la cistationina-gamma sintasa,
- 9) el gen metC, que codifica la cistationina-gamma liasa,
- 10) el gen meth, que codifica la metionina sintasa,
- 11) el gen glyA, que codifica la serina hidroximetiltransferasa,
- 12) el gen metY, que codifica la O-acetilhomoserina sulfhidrilasa,
- 13) el gen metF, que codifica la metilentetrahidrofolato reductasa,

- 14) el gen serC, que codifica la fosfoserina aminotransferasa,
- 15) el gen serB, que codifica la fosfoserina fosfatasa,
- 16) el gen cysE, que codifica la serina acetil-transferasa,
- 17) el gen cysK, que codifica la cisteína sintasa,
- 5 18) el gen hom, que codifica la homoserina deshidrogenasa.

De acuerdo con otra forma de realización del procedimiento conforme al invento se fermentan unas bacterias corineformes, en las que se ha mutado al mismo tiempo por lo menos uno de los genes, que se escogen entre genes de los conjuntos 1) hasta 18) arriba mencionados, de tal manera que las correspondientes proteínas, comparadas con unas proteínas no mutadas, sean influidas en su actividad en una más pequeña medida o no sean influidas en absoluto por los metabolitos del metabolismo, y que no sea perjudicada en particular la producción conforme al invento de L-metionina, o de tal manera que sea aumentada su actividad enzimática específica.

De acuerdo con otra forma de realización del procedimiento conforme al invento, se fermentan unas bacterias corineformes, en las que se ha debilitado al mismo tiempo por lo menos uno de los genes, escogidos entre

- 19) el gen thrB, que codifica la homoserina cinasa,
- 20) el gen ilvA, que codifica la treonina deshidratasa,
- 21) el gen thrC, que codifica la treonina sintasa,
- 22) el gen ddh, que codifica la meso-diaminopimelato D deshidrogenasa,
- 20 23) el gen pck, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxicinasa,
- 24) el gen pgi, que codifica la glucosa-6-fosfato isomerasa,
- 25) el gen poxB, que codifica la piruvato oxidasa,
- 26) el gen dapA, que codifica la dihidropicolinato sintasa,
- 27) el gen dapB, que codifica la dihidropicolinato reductasa; o
- 25 28) el gen lysA, que codifica la diaminopicolinato descarboxilasa,

en particular mediante disminución de la tasa de expresión del correspondiente gen.

De acuerdo con otra forma adicional de realización del procedimiento conforme al invento, se fermentan unas bacterias corineformes, en las que se ha mutado al mismo tiempo por lo menos uno de los genes de los conjuntos 19) hasta 28) anteriores, de tal manera que la actividad enzimática de la correspondiente proteína sea disminuida parcial o totalmente.

De manera preferida, en el procedimiento conforme al invento se emplean unos microorganismos de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

Otro objeto del invento se refiere a un procedimiento para la producción de un aditivo en piensos para animales que contiene L-metionina a partir de caldos de fermentación, el cual comprende las siguientes etapas

- a) cultivación y fermentación de un microorganismo que produce L-metionina, con una actividad disminuida de metK de acuerdo con la definición arriba mencionada, en un medio de fermentación;
- 40 b) eliminación de agua a partir del caldo de fermentación que contiene L-metionina;
- c) eliminación de la biomasa formada durante la fermentación en una proporción de 0 a 100 % en peso; y
- d) desecación del caldo de fermentación obtenido de acuerdo con b) y/o c), con el fin de obtener el aditivo en piensos para animales en la deseada forma de un polvo o granulado.

La descripción se refiere además a unos polinucleótidos aislados, que codifican un polipéptido con una actividad disminuida de metK de acuerdo con la definición dada más arriba; así como a unos mutantes de metK con una actividad disminuida, que son codificados por estos polinucleótidos.

Además, son un objeto de la descripción unas bacterias corineformes recombinantes, que expresan un gen metK mutado de acuerdo con la definición dada más arriba, y en particular aquellas bacterias corineformes recombinantes que ya no expresan la enzima metK de tipo silvestre.

Las bacterias corineformes recombinantes muestran, en comparación con la correspondiente cepa de tipo silvestre, por lo menos una de las siguientes características:

- a) un más pequeño título intracelular de S-adenosil-metionina,
- b) una más pequeña concentración intracelular de la S-adenosil-metionina sintasa, o
- c) una actividad más pequeña de la S-adenosil-metionina sintasa, determinada con ayuda de la tasa de formación de S-adenosil-metionina;
- y adicionalmente de manera eventual por lo menos una de las siguientes características:
- 60 d) una actividad mejorada de metY, o
- e) una cantidad aumentada de L-metionina.

Descripción detallada del invento

## a) Conceptos generales

5 Como proteínas con la actividad biológica de la "S-adenosil-metionina sintasa", que se menciona de manera abreviada también como metK (E.C.2.5.1.6), se designan aquellas proteínas, que están en situación de convertir químicamente a la L-metionina y al ATP en S-adenosil-metionina. Para un experto en la especialidad son conocidos otros detalles de la proteína metK. La actividad enzimática de metK se puede detectar mediante ensayos enzimáticos, unas prescripciones para ello se encuentran en la cita de: Markham, G.D. y colaboradores (1983)  
10 Methods in Enzymology 94:219-222.

Dentro del marco del presente invento, los conceptos de "L-metionina" y "metionina" abarcan también a las correspondientes sales, tales como p.ej. el hidrocloreto de metionina o el sulfato de metionina.

15 El concepto de "polinucleótidos" designa por lo general a polirribonucleótidos (ARN) y a polidesoxirribonucleótidos (ADN), pudiéndose tratar de unos ARN o ADN no modificados o de unos ARN o ADN modificados.

Por el concepto de "polipéptidos" se entienden conforme al invento péptidos o proteínas, que contienen dos o más aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos.

20 El concepto de "metabolito del metabolismo" designa a unos compuestos químicos, que se presentan en el metabolismo de organismos como productos intermedios o también finales y que, junto a su propiedad como eslabones químicos, también pueden tener un efecto modulador sobre ciertas enzimas y sobre su actividad catalítica. En este caso, a partir de la bibliografía es conocido el hecho de que tales metabolitos del metabolismo pueden actuar sobre la actividad de ciertas enzimas, tanto inhibiéndola como también estimulándola (Biochemistry, Stryer, Lubert, 1995 W. H. Freeman & Company, Nueva York, Nueva York). En la bibliografía se ha descrito también que, mediante ciertas medidas técnicas, tales como una mutación del ADN genómico mediante radiación UV (ultravioleta), radiación ionizante o sustancias mutágenas y una subsiguiente selección en cuanto a determinados fenotipos, es posible producir en organismos unas enzimas tales, en las que se había modificado la influencia por medio de metabolitos del metabolismo (Sahm H., Eggeling L., de Graaf A. A. Biological Chemistry 381 (9-10):899-910, 2000; Eikmanns BJ., Eggeling L., Sahm H., Antonie van Leeuwenhoek. 64:145-63, 1993-94). Estas propiedades modificadas se pueden conseguir también mediante unas medidas técnicas deliberadas. En este contexto, es conocido para un experto en la especialidad el hecho de modificar en genes para enzimas también deliberadamente a determinados nucleótidos del ADN que codifica la proteína, de tal manera que la proteína resultante a partir de la secuencia expresada de ADN tenga unas determinadas propiedades nuevas. Así, por ejemplo, se puede conseguir que el efecto modulador de metabolitos del metabolismo sea modificado frente al de la proteína no modificada. Las enzimas pueden ser influidas en su actividad también de tal manera que se llegue a una disminución de la velocidad de reacción, o a una modificación de la afinidad frente a la del sustrato.

40 Los conceptos de "expresar" o respectivamente "reforzamiento" o "sobrexpresión" describen, dentro del contexto del invento, la producción o respectivamente el aumento de la actividad intracelular de una o varias enzimas en un microorganismo, que es/son codificada(s) por el correspondiente ADN. Para esto, se puede, por ejemplo, incorporar un gen en un organismo, reemplazar un gen presente por otro gen distinto, aumentar el número de copias del gen o respectivamente de los genes, utilizar un promotor fuerte o utilizar un gen, que codifica una correspondiente enzima con una alta actividad, y eventualmente se pueden combinar estas medidas técnicas.

Los conceptos de "debilitar" y "disminuir" describen, dentro del contexto del invento, el debilitamiento o la disminución de la actividad intracelular de una o varias enzimas en un microorganismo, que es/son codificada(s) por el correspondiente ADN. Para esto, se puede, por ejemplo, suprimir un gen en un organismo, reemplazar un gen presente por otro gen distinto, disminuir el número de copias de un transcrito del gen o respectivamente de los genes, utilizar un promotor débil o utilizar un gen, que codifica una correspondiente enzima con una actividad más baja, y eventualmente se pueden combinar estas medidas técnicas.

55 La "actividad disminuida" de un mutante conforme al invento de la S-adenosil-metionina sintasa o de un equivalente funcional se puede determinar mediante la comparación con la actividad de la S-adenosil-metionina sintasa natural, tal como p.ej. la procedente de *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre, ATCC 13032. de manera adecuada, para esto se aportan unos plásmidos, que se replican en *Corynebacterium glutamicum*, y que llevan los genes para mutantes de la S-adenosil-metionina sintasa, mediante transformación p.ej. en el seno de *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre, ATCC 13032. Además, se introducen unos correspondientes plásmidos en *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre, ATCC 13032, que expresan la enzima de tipo silvestre S-adenosil-metionina sintasa. Los transformantes de *Corynebacterium glutamicum* obtenidos de tal manera son cultivados en medios apropiados y cosechados en la fase logarítmica del crecimiento con la misma  $DO_{600}$  (Densidad Óptica a 600 nm). Después de esto, a partir de las células cosechadas de ambos transformantes se producen extractos de proteínas, según unos protocolos conocidos. Unas cantidades iguales de estos extractos de proteínas (después de la determinación de las proteínas) se emplean entonces en un ensayo de la S-adenosil-metionina sintasa según Markham, G.D. y colaboradores (1983) Methods in Enzymology 94: 219-222. La radiactividad de la S-adenosil-

metionina formada se determina en un contador de escintilación. Tomando en cuenta la actividad específica de la L-metionina radiactiva, así como la cantidad empleada de proteínas, la tasa de la formación de S-adenosil-metionina se puede determinar a partir del aumento de la radiactividad incorporada por unidad de tiempo. Su unidad se expresa como  $\mu\text{mol}$  de S-adenosil-metionina/min\*mg de proteína. Esta tasa puede ser comparada entre la enzima de tipo silvestre y la enzima mutante. Según el mismo principio, partiendo de otras enzimas de tipo silvestre con una actividad de S-adenosil-metionina sintasa, se pueden producir unos mutantes útiles conformes al invento.

Una "actividad disminuida" conforme al invento se presenta en particular cuando la actividad específica del mutante haya disminuido hasta una actividad restante de aproximadamente 1 a 90 %, de manera preferida de 3 a 70 %, tal como p.ej. de 5 a 10 % de la actividad del tipo silvestre.

b) Proteínas metK descritas

Las secuencias descritas de polinucleótidos codifican unas proteínas con una actividad modificada, en particular disminuida, de S-adenosil-metionina sintasa, de acuerdo con la definición arriba mencionada.

De manera preferida, los mutantes útiles conformes al invento son accesibles por sustitución de uno o varios restos de cisteína conservados dentro de la secuencia de aminoácidos de la metK de bacterias gram positivas y/o gram negativas, o en particular de bacterias corineformes. Los restos de cisteína conservados son fácilmente comprobables con ayuda de alineaciones de secuencias. Como ejemplos no restrictivos de restos Cys conservados en S-adenosil-metionina sintasas procedentes de bacterias se han de mencionar los Cys24 y Cys94 de la enzima de *C. glutamicum*, que se encuentran en un gran número de bacterias.

En un conjunto preferido de mutantes, los Cys24 y/o Cys94 (según el metK procedente de *C. glutamicum* ATCC 13032) han sido reemplazados por un aminoácido distinto del Cys, de manera preferida por alanina, con lo que se disminuye la actividad enzimática del modo antes mencionado.

Unos "equivalentes funcionales" o compuestos análogos a los polipéptidos divulgados en concreto son dentro del marco de la presente descripción unos polipéptidos distintos de éstos, que siguen poseyendo la actividad biológica deseada, tal como p.ej. una especificidad para un cierto sustrato.

Por el concepto de "equivalentes funcionales" se entienden conforme al invento en particular unos mutantes, que en por lo menos una de las posiciones antes mencionadas de la secuencia tienen un aminoácido distinto del aminoácido mencionado en concreto, pero que poseen de todas formas una de las actividades biológicas arriba mencionadas. El concepto de "equivalentes funcionales" abarca por consiguiente a los mutantes obtenibles por una o varias adiciones, sustituciones, supresiones (delecciones) y/o inversiones de aminoácidos, pudiendo aparecer las modificaciones mencionadas en cualquier posición de la secuencia, siempre y cuando que ellas conduzcan a un mutante con el perfil de propiedades conforme al invento. Una equivalencia funcional se presenta en particular también cuando los modelos de reactividades entre un mutante y un polipéptido no modificado coincidan cualitativamente, es decir que por ejemplo, los mismos sustratos sean convertidos químicamente con una diversa velocidad.

Los "equivalentes funcionales" abarcan naturalmente también unos polipéptidos que son accesibles a partir de otros organismos, así como unas variantes que se presentan en la naturaleza. Por ejemplo, mediante una comparación de secuencias se pueden establecer unas zonas de regiones de secuencias homólogas, y apoyándose en los antecedentes concretos del invento, se pueden determinar unas enzimas equivalentes.

Los "equivalentes funcionales" abarcan asimismo unos fragmentos, de manera preferida dominios o motivos de secuencias individuales, de los polipéptidos conformes al invento, que tienen p.ej. la función biológica deseada.

Son "equivalentes funcionales" además unas proteínas de fusión, que tienen una de las secuencias de polipéptidos arriba mencionadas o unos equivalentes funcionales derivados de éstas, y por lo menos otra secuencia heteróloga, funcionalmente distinta de éstas, en unión funcional por el extremo de N o C (es decir sin ningún perjuicio funcional esencial recíproco de las partes de las proteínas de fusión). Unos ejemplos no limitativos de tales secuencias heterólogas son p.ej. péptidos de señal, enzimas, inmunoglobulinas, antígenos superficiales, receptores o ligandos de receptores.

Unos "equivalentes funcionales" abarcados conjuntamente conforme al invento, son unos homólogos con respecto a las proteínas concretamente divulgadas. Éstos poseen por lo menos un 20 %, 30 % o aproximadamente un 40 %, 50 %, de manera preferida por lo menos aproximadamente un 60 %, 65 %, 70 % o 75 %, en particular por lo menos un 85 % tal como p.ej. un 90 %, 95 % o 99 %, de homología con respecto a una de las secuencias divulgadas concretamente, calculado según el algoritmo de Pearson y Lipman, Proc. Natl., Acad, Sci (USA) 85(8), 1988, 2444-2448.

Los mutantes y análogos funcionales contienen la secuencia parcial característica

**G(FY)(D/S)X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>(S/T)X<sup>3</sup>(G/A)V**

de acuerdo con la definición arriba mencionada; representando X<sup>3</sup> un aminoácido distinto de Cys, introducido mediante mutación, en particular alanina. X<sup>3</sup> corresponde al Cys94 de la secuencia de metK de tipo silvestre de *C. glutamicum* (SEQ ID NO:16). X<sup>2</sup> representa de manera preferida Ala, Glu, Asp, Asn o Arg; y X<sup>1</sup> representa de manera preferida Gly, Cys, Ser o Ala.

Ciertos homólogos de las proteínas o los polipéptidos que se han descrito pueden ser producidos mediante mutagénesis, p.ej. mediante una mutación puntual o un acortamiento de la proteína. El concepto de "homólogo", tal como se utiliza aquí, se refiere a una forma variante de la proteína, que actúa como un agonista o antagonista de la actividad de la proteína.

Ciertos homólogos de las proteínas descritas pueden ser identificados mediante escrutinio de bancos combinatorios de mutantes, tales como p.ej. de mutantes por acortamiento. Por ejemplo, un banco variopinto de variantes de proteínas se puede producir mediante una mutagénesis combinatoria en el plano de los ácidos nucleicos, tal como p.ej. mediante una ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos. Existe un gran número de procedimientos, que se pueden utilizar para la producción de bancos de homólogos potenciales a partir de una secuencia degenerada de oligonucleótidos. La síntesis química de una secuencia degenerada de un gen se puede llevar a cabo en un equipo automático de síntesis de ADN, y el gen sintético se puede ligar entonces dentro de un vector de expresión adecuado. La utilización de un conjunto degenerado de genes hace posible la puesta a disposición de todas las secuencias en una mezcla, que codifican el conjunto deseado de secuencias proteínicas potenciales. Unos procedimientos para la síntesis de oligonucleótidos degenerados son conocidos para un experto en la especialidad (p.ej. a partir de las citas de Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura y colaboradores (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura y colaboradores, (1984) *Science* 198:1056.; Ike y colaboradores (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:477).

Adicionalmente, se pueden utilizar bancos de fragmentos del codón de proteínas, con el fin de producir una población variopinta de fragmentos de proteínas para el escrutinio y la subsiguiente selección de homólogos de una proteína conforme al invento. En el caso de una forma de realización, se puede producir un banco de fragmentos codificadores de secuencias por tratamiento de un fragmento bicatenario de PCR de una secuencia codificadora con una nucleasa, en unas condiciones, bajo las que la rotura de una monocadena de ADN (en inglés "nicking") se efectúa aproximadamente sólo una vez por cada molécula, desnaturalización del ADN bicatenario, renaturalización del ADN mediando formación de un ADN bicatenario, que puede abarcar los pares de sentido/antisentido de diferentes productos rotos de una monocadena de ADN, mediante eliminación de segmentos monocatenarios a partir de unos duplicados que se han formado de nuevas mediante tratamiento con una nucleasa S1 y ligación del resultante banco de fragmentos en un vector de expresión. Por medio de este procedimiento se puede deducir un banco de expresión, que codifica unos fragmentos terminales de N y terminales de C e internos con diferentes tamaños de la proteína conforme al invento.

Dentro del estado de la técnica se conocen varias técnicas para realizar la mutagénesis de genes: veáanse las citas de Coco, WM y colaboradores 2001. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes [Método de barajadura de los ADN para generar genes altamente recombinados y enzimas desarrolladas]. *Nature Biotechnol.* 19:354-359; el documento de patente alemana de 19953854; de Leung DW y colaboradores 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction [Un método para la mutagenesis aleatoria de un segmento definido de ADN por uso de una modificada reacción en cadena de la polimerasa]. *Technique* 1:11-15; de Stemmer WPC 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution [Barajadura de los ADN mediando fragmentación y reensamblaje aleatoria/o: recombinación in vitro para la evolución molecular]. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91:10747-10751; y documento de patente de los EE.UU. US 5811238. Estos procedimientos se pueden emplear para la producción de mutantes útiles conformes al invento.

Dentro del estado de la técnica se conocen varias técnicas para realizar el escrutinio de productos génicos de bancos combinatorios, que han sido producidos mediante mutaciones puntuales o acortamiento, y para el escrutinio de bancos de ADNc (cromosómicos) en cuanto a productos génicos con una propiedad escogida. Estas técnicas se pueden adaptar al escrutinio rápido de los bancos de genes, que han sido producidos por mutagénesis combinatoria de homólogos conformes al invento. Las técnicas más frecuentemente utilizadas para el escrutinio de grandes bancos de genes, que son sometidos a un análisis con un alto caudal de paso, abarcan la clonación del banco de genes en vectores de expresión replicables, la transformación de las células adecuadas con el resultante banco de vectores y la expresión de los genes combinatorios en unas condiciones, bajo las que la detección de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector, que codifica el gen, cuyo producto había sido detectado. La mutagénesis de conjunto recursivo (en inglés Recursive-Ensemble-Mutagenesis (REM)), que es una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en los bancos, se puede utilizar en combinación con los ensayos de escrutinio, con el fin de identificar a ciertos homólogos (Arkin y Yourvan (1992) *PNAS* 89:7811-7815; Delgrave y colaboradores (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331).

c) Polinucleótidos descritos

Asimismo, son objeto de la descripción unas secuencias de ácidos nucleicos (secuencias de ADN y ARN mono- y bicatenarios, tales como p.ej. un ADNc (cromosómico) y un ARNm (mensajero)), que codifican una enzima metK y sus equivalentes funcionales, que son accesibles p.ej. también mediando utilización de compuestos artificiales análogos a nucleótidos.

La descripción se refiere tanto a unas moléculas aisladas de ácidos nucleicos, que codifican los polipéptidos o respectivamente las proteínas que se han mencionado o unos segmentos biológicamente activos de éstos/as, así como unos fragmentos de ácidos nucleicos, que se pueden utilizar p.ej. como sondas de hibridación o como cebadores para la identificación o amplificación de ácidos nucleicos codificadores conformes al invento.

Las moléculas descritas de ácidos nucleicos pueden contener además unas secuencias no traducidas de los extremos 3' y/o 5' de la región codificadora del gen.

Una molécula "aislada" de ácido nucleico es separada con respecto de otras moléculas de ácidos nucleicos, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico y ella puede estar además esencialmente exenta de otro material celular o medio de cultivo, cuando ella se produce por medio de técnicas recombinantes, o puede estar exenta de compuestos precursores químicos o de otros productos químicos, cuando es sintetizada por vía química.

La descripción abarca además a las moléculas de ácidos nucleicos complementarias con respecto a las secuencias de nucleótidos concretamente descritas o a un segmento de éstas.

Las descritas secuencias de nucleótidos hacen posible la producción de sondas y cebadores, que son utilizables para la identificación y/o clonación de secuencias homólogas en otros tipos de células y organismos. Tales sondas o respectivamente cebadores abarcan habitualmente una región de secuencia de nucleótidos, que se hibrida en condiciones rigurosas con por lo menos aproximadamente 12, de manera preferida por lo menos aproximadamente 25, tal como p.ej. aproximadamente 40, 50 o 75 nucleótidos consecutivos de una cadena de sentido de una secuencia de ácido nucleico conforme al invento o de una correspondiente cadena de antisentido.

Otras secuencias descritas de ácidos nucleicos se derivan de la SEQ ID NO:21 y se diferencian de ésta por adición, sustitución, inserción o supresión (delección) de nucleótidos individuales o de varios de ellos, pero siguen codificando unos polipéptidos con el deseado perfil de propiedades. Éstos pueden ser unos polinucleótidos, que son idénticos a las secuencias arriba mencionadas en por lo menos aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 80 % o 90 %, de manera preferida en por lo menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las posiciones de la secuencia.

La descripción abarca también a las secuencias de ácidos nucleicos que comprenden unas denominadas mutaciones mudas, o que correspondientemente al aprovechamiento de codones de un organismo original o anfitrión especial, han sido modificadas en comparación con una secuencia mencionada en concreto, al igual que unas variantes que se presentan en la naturaleza, tales como p.ej. variantes alélicas, de éstas. Asimismo son objeto unas secuencias obtenibles mediante sustituciones conservadoras de nucleótidos (es decir, en las que el respectivo aminoácido ha sido reemplazado por un aminoácido con la misma carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad).

Son objeto de la descripción también las moléculas que se derivan mediante polimorfismos de las secuencias de los ácidos nucleicos concretamente divulgados. Estos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población a causa de la variación natural. Estas variaciones naturales dan lugar usualmente a una varianza de un 1 a 5 % en la secuencia de nucleótidos de un gen.

Además, la descripción abarca también unas secuencias de ácidos nucleicos, que se hibridan con las secuencias codificadoras arriba mencionadas o que son complementarias con respecto a éstas. Estos polinucleótidos se pueden encontrar en el caso de un escrutinio a fondo de bancos genómicos o de ADNc y eventualmente multiplicar mediante una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a partir de éstos con unos cebadores adecuados, y a continuación aislar, por ejemplo con unas sondas adecuadas. Otra posibilidad la ofrecen la transformación de microorganismos adecuados con los polinucleótidos o vectores, la multiplicación (reproducción) de los microorganismos y por consiguiente de los polinucleótidos, y su subsiguiente aislamiento. Además de esto, los polinucleótidos se pueden sintetizar también por vía química.

Por la propiedad, de poderse "hibridar" con polinucleótidos, se entiende la capacidad de un poli- u oligonucleótido de unirse en condiciones rigurosas a una secuencia casi complementaria, mientras que en estas condiciones no tienen lugar unas uniones inespecíficas entre participantes no complementarios. Para este fin, las secuencias deberían ser complementarias en un 70-100 %, de manera preferida en un 90-100 %. La propiedad de las secuencias complementarias, de poder unirse específicamente unas con otras, se aprovecha por ejemplo en la técnica por transferencia de borrón Northern o Southern o en el caso de la unión con cebadores en una PCR o RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa). Usualmente, a este fin se emplean oligonucleótidos con una longitud a partir de 30 pares de bases. Por el concepto de "en condiciones rigurosas" se entiende, por

ejemplo, en la técnica por transferencia de borrón Northern, la utilización de una solución de lavado con una temperatura de 50 - 70°C, de manera preferida de 60 - 65°C, por ejemplo de un tampón 0,1 x SSC con 0,1 % de SDS (20 x SSC; NaCl 3 M), citrato de Na 0,3 M, valor del pH 7,0) para realizar la elución de sondas de ADNc o de oligonucleótidos hibridadas/os inespecíficamente. En este caso, tal como se ha mencionado más arriba, sólo permanecen unidos unos con otros los ácidos nucleicos que son complementarios en alta medida. El ajuste de unas condiciones rigurosas es conocido para un experto en la especialidad y se ha descrito p.ej. en la cita de Ausubel y colaboradores, Current Protocols in Molecular Biology [Protocolos Actuales en la Biología Molecular], John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

10 d) Aislamiento de los genes metK codificadores y de otros genes

Los genes metK, que codifican la enzima S-adenosil-metionina sintasa (EC 2.5.1.6), son aislables de un modo de por sí conocido.

15 Para el aislamiento de los genes metK o también de otros genes de otros organismos se establece primeramente un banco de genes de este organismo en Escherichia coli (E. coli). El establecimiento de bancos de genes se ha descrito detalladamente en unos libros de texto y manuales, que son conocidos por lo general. Como ejemplos de ellos se mencionarán el libro de texto de Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie [Genes y clones, una introducción en la tecnología genética] (Verlag Chemie, Weinheim, Alemania, 1990), o el manual de Sambrook y colaboradores: Molecular Cloning, A Laboratory Manual [Clonación molecular, un manual de laboratorio] (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un banco de genes muy conocido es el de la cepa W3110 K-12 de E. coli, que fue establecido por Kohara y colaboradores (Cell 50, 495-508 (198)) en vectores λ.

25 Para la producción de un banco de genes en E. coli se pueden utilizar unos cósmidos, tales como el vector cosmídico SuperCos I (Wahl y colaboradores (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences USA [Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los EE.UU.] 84: 2160-2164), pero también unos plásmidos, tales como el pBR322 (Bolivar; Life Sciences. 25, 807-818 (1979)) o el pUC9 (Vieira y colaboradores, 1982, Gene, 19: 259-268). Como anfitriones se adecuan en particular aquellas cepas de E. coli, que son defectuosas en cuanto a la restricción y la recombinación. Un ejemplo de éstas es la cepa DH5αmc, que fue descrita por Grant y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649). Los largos fragmentos de ADN clonados con ayuda de cósmidos se pueden subclonar a continuación por su parte en vectores habituales, adecuados para la secuenciación y a continuación secuenciar, tal como se ha descrito p.ej. en la cita de Sanger y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74: 5463-5461, 1977).

35 Las secuencias de ADN obtenidas pueden ser investigadas entonces con los algoritmos conocidos o respectivamente con programas de análisis de secuencias, tales como p.ej. el de Staden (Nucleic Acids Research (1986) 14, 217-232), el de Marck (Nucleic Acids Research (1988) 16, 1829-1836) o el programa GCG de Butler (Methods of Biochemical Analysis (1998) 39, 74-97).

40 Unas instrucciones para la identificación de secuencias de ADN mediante una hibridación las encontrará un experto en la especialidad, entre otros lugares, en el manual "The DIG-System Users Guide for Filter Hybridization" [La guía de los usuarios del sistema DIG para la hibridación en filtros de la entidad Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania 1993) y en la cita de Liebl y colaboradores (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Unas instrucciones para realizar la amplificación de secuencias de ADN con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las encontrará un experto en la especialidad, entre otros lugares, en el manual de Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach [Síntesis de oligonucleótidos, un enfoque práctico] (IRL Press, Oxford, GB, 1984) y en la cita de Newton y Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994).

50 Además, es conocido que ciertas modificaciones junto a los terminales de N y/o de C de una proteína no pueden perjudicar esencialmente a su función o incluso pueden estabilizarla. Unos datos acerca de esto los encontrará un experto en la especialidad, entre otros lugares, en las citas de Ben-Bassat y colaboradores (1987) Journal of Bacteriology 169: 751-757, de O'Regan y colaboradores (1989) Gene 77: 237-251, de Sahin-Toth y colaboradores (1994) Protein Sciences 3: 240-247, y de Hochuli y colaboradores (1988) Biotechnology 6: 1321-1325, y en los conocidos libros de texto de genética y biología molecular.

e) Células anfitrionas utilizadas

60 Para el procedimiento conforme al invento se utilizan de manera preferida bacterias corineformes, cuya actividad de metK disminuida es detectable a través de por lo menos una de las siguientes propiedades:

- a) un título intracelular de S-adenosil-metionina más pequeño en comparación con el de la cepa de tipo silvestre;
- b) una concentración intracelular más pequeña de la S-adenosil-metionina sintasa (menos cantidad de S-adenosil-metionina sintasa, referida a la proteína total); o

65

- c) una actividad intracelular más pequeña de S-adenosil-metionina sintasa (menos actividad enzimática de S-adenosil-metionina sintasa, referida al contenido de la proteína S-adenosil-metionina sintasa).

5 Todas estas propiedades son determinables de un modo sencillo por un experto en la especialidad, eventualmente mediando aprovechamiento de la presente descripción.

10 Otros objetos de la descripción conciernen en particular a unos microorganismos que sirven como células anfitrionas, en particular unas bacterias corineformes, que contienen un vector, en particular un vector pendulante o un vector plasmídico, que lleva por lo menos un gen metK con la definición conforme al invento, o en las que se expresa un gen metK conforme al invento con una actividad disminuida.

15 Estos microorganismos pueden producir productos químicos finos que contienen azufre, p.ej. L-metionina, a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, un almidón, una celulosa o a partir de glicerol y etanol. Ellos son bacterias corineformes, en particular del género *Corynebacterium*. Dentro del género *Corynebacterium* se ha de mencionar en particular la especie *Corynebacterium glutamicum*, que es conocida en el mundo especializado por su capacidad de producir L-aminoácidos.

20 Como ejemplos de cepas adecuadas de bacterias corineformes se exponen las del género *Corynebacterium*, en particular de la especie *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), tales como  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032,  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806,  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870,  
*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539,  
*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965

25 o  
 las del género *Brevibacterium*, tales como  
*Brevibacterium flavum* ATCC 14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 y  
 30 *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020;  
 o unas cepas derivadas de éstas, tales como  
*Corynebacterium glutamicum* KFCC10065  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC21608

35 que producen asimismo L-metionina o su(s) compuesto(s) precursor(es). (KFCC = Korean Federation of Culture Collection (Federación Coreana de Colección de Cultivos); ATCC = American Type Culture Collection (Colección americana de cultivos tipo))

- 40 f) Realización de la fermentación conforme al invento

Conforme al invento se comprobó que, después de una expresión de un gen metK conforme al invento, las bacterias corineformes producen de un modo ventajoso L-metionina.

45 Con el fin de disminuir la actividad o cantidad de una enzima, p.ej. de la S-adenosil-metionina sintasa, metK, un experto en la especialidad puede ejecutar diferentes medidas técnicas individualmente o en combinaciones. Mediante una reducción de la frecuencia de transcripción del gen, que codifica la proteína conforme al invento, se puede disminuir la concentración de la correspondiente proteína. Esto lo puede conseguir un experto en la especialidad mediante modificación o intercambio de la región promotora o de regulación, así como del sitio de fijación a ribosomas del gen codificador. Corriente abajo de la región codificadora, un experto en la especialidad  
 50 puede modificar unos terminadores o introducir unas secuencias, que conducen a una estabilidad disminuida del transcrito. Estas medidas que disminuyen la duración de vida del ARNm, hacen posible disminuir la expresión de la respectiva proteína y, por consiguiente, su concentración.

55 En el plano de la enzima expresada, unas secuencias fusionadas pueden conducir a una tasa aumentada de degradación y por consiguiente asimismo a una disminución de la concentración de la proteína. Además, un experto en la especialidad, mediante una mutagénesis deliberada o no dirigida del gen codificador, puede modificar la actividad, la afinidad para el sustrato y la especificidad para el sustrato. Las enzimas pueden ser influidas en su actividad por medio de mutaciones en los correspondientes genes de tal manera que se llegue a una disminución parcial o completa de la velocidad de reacción de la reacción enzimática. Ejemplos de tales mutaciones son conocidos para un experto en la especialidad (Motoyama H. Yano H. Terasaki Y. Anazawa H. Applied &  
 60 Environmental Microbiology. 67:3064-70, 2001, Eikmanns BJ. Eggeling L. Sahm H. Antonie van Leeuwenhoek. 64:145-63, 1993-94). Unos mutantes de la proteína pueden conducir también a una homo- o heteromultimerización disminuida o impedida de complejos enzimáticos, y por ello, asimismo, a un empeoramiento de las propiedades enzimáticas.

65

Unos genes modificados de tal modo pueden presentarse integrados o bien en plásmidos o de manera preferida en el cromosoma. En este caso, el gen original, no modificado de esta manera, puede estar todavía adicionalmente presente, pero de manera preferida haber sido reemplazado por el gen modificado.

5 Con el fin de disminuir la actividad de una enzima, p.ej. de la S-adenosil-metionina sintasa (metK), medida en una bacteria corineforme, puede ser suficiente expresar unos genes, que codifican unos equivalentes funcionales, tales como unos mutantes producidos artificialmente o unos homólogos naturales de otros organismos. En este caso, el gen original puede estar todavía presente de manera adicional, pero preferiblemente puede ser reemplazado por el gen modificado o el gen homólogo.

10 Adicionalmente, para la producción de L-metionina por fermentación en bacterias corineformes puede ser ventajoso, junto a una expresión de un gen metK conforme al invento, reforzar a una o varias enzimas de la respectiva ruta de biosíntesis, de la ruta metabólica de la cisteína, de la síntesis de aspartato-semialdehído, de la glicólisis, de reacciones anapleróticas, del metabolismo de pentosa y fosfato, del ciclo del ácido cítrico, o de la exportación de aminoácidos.

Así, para la producción de productos químicos finos que contienen azufre, en particular de L-metionina, puede ser reforzado uno o varios de los siguientes genes:

- 20 - el gen lysC, que codifica la aspartato cinasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 281),
- el gen asd, que codifica una aspartato-semialdehído deshidrogenasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 282),
- el gen gap, que codifica la glicerolaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- 25 - el gen pgk, que codifica la 3-fosfoglicerato cinasa (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- el gen pyc, que codifica la piruvato carboxilasa (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- el gen tpi, que codifica la triosafofosfato isomerasa (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- el gen metA, que codifica la homoserina O-acetiltransferasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 725),
- el gen metB, que codifica la cistationina-gamma sintasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3491),
- el gen metC, que codifica la cistationina-gamma liasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3061),
- 30 - el gen metH, que codifica la metionina sintasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 1663),
- el gen glyA, que codifica la serina hidroximetiltransferasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 1110),
- el gen metY, que codifica la O-acetilhomoserina sulfhidrilasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 726),
- el gen metF, que codifica la metilentetrahidrofolato reductasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 2379),
- 35 - el gen serC, que codifica la fosfoferina aminotransferasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 928)
- el gen serB, que codifica la fosfoferina fosfatasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 334, SEQ de ADN NO. 467, SEQ de ADN NO. 2767),
- el gen cysE, que codifica la serina acetil-transferasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 2818),
- el gen cysK, que codifica la cisteína sintasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 2817),
- 40 - el gen hom, que codifica la homoserina deshidrogenasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 1306)

Así, para la producción de L-metionina en bacterias corineformes puede ser ventajoso mutar al mismo tiempo por lo menos uno de los siguientes genes, de tal manera que las correspondientes proteínas, comparadas con unas proteínas no mutadas, sean influidas en su actividad sólo en más pequeña medida o no sean influidas por un metabolito del metabolismo, o de tal manera que se aumente su actividad específica:

- el gen lysC, que codifica la aspartato cinasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 281),
- el gen pyc, que codifica la piruvato carboxilasa (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- 50 - el gen metA, que codifica la homoserina O-acetiltransferasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 725),
- el gen metB, que codifica la cistationina-gamma sintasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3491),
- el gen metC, que codifica la cistationina-gamma liasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3061),
- el gen metH, que codifica la metionina sintasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 1663),
- el gen glyA, que codifica la serina hidroximetiltransferasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 1110),
- el gen metY, que codifica la O-acetilhomoserina sulfhidrilasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 726),
- 55 - el gen metF, que codifica la metilentetrahidrofolato reductasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 2379),
- el gen serC, que codifica la fosfoferina aminotransferasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 928)
- el gen serB, que codifica la fosfoferina fosfatasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 334, SEQ de ADN NO. 467, SEQ de ADN NO. 2767),
- 60 - el gen cysE, que codifica la serina acetil-transferasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 2818),
- el gen cysK, que codifica la cisteína sintasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 2817),
- el gen hom, que codifica la homoserina deshidrogenasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 1306)

Además, para la producción de L-metionina puede ser ventajoso, adicionalmente a la expresión de uno de los genes metK conformes al invento, debilitar a uno o varios de los siguientes genes, en particular disminuir su expresión o desconectarlo(s):

- 5 - el gen thrB, que codifica la homoserina cinasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3453)
- el gen ilvA, que codifica la treonina deshidratasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 2328)
- el gen thrC, que codifica la treonina sintasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3486)
- el gen ddh, que codifica la meso-diaminopimelato D deshidrogenasa (documento EP 1 108 790 A2; DNA-SEO NO. 3494)
- 10 - el gen pck, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxicinas (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3157)
- el gen pgi, que codifica la glucosa-6-fosfato-6-isomerasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 950)
- el gen poxB, que codifica la piruvato oxidasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 2873)
- el gen dapA, que codifica la dihidropicolinato sintasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3476)
- el gen dapB, que codifica la dihidropicolinato reductasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3477)
- 15 - el gen lysA, que codifica la diaminopicolinato descarboxilasa (documento EP 1 108 790 A2; DNA- SEQ NO. 3451)

Además, para la producción de L-metionina puede ser ventajoso, adicionalmente a la expresión de uno de los genes de metK conformes al invento en bacterias corineformes, mutar al mismo tiempo por lo menos a uno de los siguientes genes, de tal manera que la actividad enzimática de la correspondiente proteína sea disminuida parcial o totalmente:

- el gen thrB, que codifica la homoserina cinasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3453)
- el gen ilvA, que codifica la treonina deshidratasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 2328)
- el gen thrC, que codifica la treonina sintasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3486)
- 25 - el gen ddh, que codifica la meso-diaminopimelato D deshidrogenasa (documento EP 1 108 790 A2; DNA-SEO NO. 3494)
- el gen pck, que codifica la fosfoenolpiruvato-carboxicinas (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3157)
- el gen pgi, que codifica la glucosa-6-fosfato-6-isomerasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 950)
- el gen poxB, que codifica la piruvato oxidasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 2873)
- 30 - el gen dapA, que codifica la dihidropicolinato sintasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3476)
- el gen dapB, que codifica la dihidropicolinato reductasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3477)
- el gen lysA, que codifica la diaminopicolinato descarboxilasa (documento EP 1 108 790 A2; SEQ de ADN NO. 3451)

- 35 Además, para la producción de L-metionina puede ser ventajoso, junto a la expresión de un gen metK conforme al invento, desconectar reacciones secundarias indeseadas (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms" [Crianza de microorganismos que producen aminoácidos], en: Overproduction of Microbial Products [Sobreproducción de productos microbianos], Krumphanzl, Sikyta, Vanek (coordinadores de edición), Academic Press, Londres, GB (Gran Bretaña), 1982).

- 40 Para la consecución de una sobreexpresión, un experto en la especialidad puede adoptar diferentes medidas técnicas individualmente o en combinación. Así, se puede aumentar el número de copias de los correspondientes genes, o se puede mutar a la región de promotor y de regulación o al sitio de fijación a cromosomas, que se encuentra corriente arriba del gen estructural. De igual manera actúan unos casetes de expresión, que son incorporados corriente arriba del gen estructural. Mediante unos promotores inducibles es adicionalmente posible aumentar la expresión en el transcurso de la producción por fermentación de L-metionina. Por medio de unas medidas técnicas para la prolongación de la duración de vida del ARNm se mejora asimismo la expresión. Además, mediante la evitación de la degradación de la proteína enzimática se refuerza asimismo la actividad enzimática. Los genes o las construcciones artificiales génicas pueden presentarse o bien en plásmidos con diferentes números de copias o ser integrados/as y amplificados/as en un cromosoma. Alternativamente, se puede alcanzar además una sobreexpresión de los correspondientes genes mediante una modificación de la composición de los medios y una conducción del cultivo.

- 55 Instrucciones acerca de esto las puede encontrar un experto en la especialidad, entre otros lugares, en las citas de Martin y colaboradores (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), de Guerrero y colaboradores (Gene 138, 35-41 (1994)), de Tsuchiya y Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), de Eikmanns y colaboradores (Gene 102, 93-98 (1991)), en el documento EP 0472869, en el documento US 4.601.893, en las citas de Schwarzer y Puhler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), de Remscheid y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994)), de LaBarre y colaboradores (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), en el documento WO 96/15246, en la cita de Malumbres y colaboradores (Gene 134, 15-24 (1993)), en el documento JP-A-10-229891, en las citas de Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58,191-195 (1998)), de Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996) y en conocidos libros de texto de genética y biología molecular.

- 65 Objeto del invento son, por lo tanto, también unas construcciones artificiales de expresión que, bajo el control genético de secuencias reguladoras de ácidos nucleicos, contienen una secuencia de ácido nucleico, que codifica un polipéptido ya mencionado; así como unos vectores, que abarcan por lo menos una de estas construcciones

artificiales de expresión. De manera preferida, tales construcciones artificiales abarcan, corriente arriba del extremo 5' de la respectiva secuencia codificadora, un promotor, y corriente abajo del extremo 3', una secuencia de terminador, así como eventualmente otros elementos reguladores usuales, y ciertamente unidos en cada caso operativamente con la secuencia codificadora. Por el concepto de "unión operativa" se entiende la disposición secuencial de un promotor, de una secuencia codificadora, de un terminador y eventualmente de otros elementos reguladores, de tal manera que cada uno de los elementos reguladores pueda cumplir su función en el caso de la expresión de la secuencia codificadora conforme a las estipulaciones. Ejemplos de secuencias que pueden ser unidas operativamente son las secuencias de activación así como unos intensificadores y similares. Otros elementos reguladores abarcan marcadores seleccionables, señales de amplificación, orígenes de la replicación y similares. Unas secuencias reguladoras adecuadas se han descrito p.ej. en la obra de Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology [Tecnología de expresión de genes: Métodos en Enzimología] 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Adicionalmente a las secuencias de regulación artificiales, la secuencia de regulación natural puede estar presente todavía delante del gen estructural propiamente dicho. Mediante una modificación genética, puede ser desconectada eventualmente esta regulación natural, y la expresión de los genes puede ser aumentada o disminuida. Sin embargo, la construcción génica puede estar estructurada también de un modo más sencillo, es decir que no se inserte ninguna señal adicional de regulación delante del gen estructural y que no sea eliminado el promotor natural con su regulación. En lugar de esto, la secuencia de regulación natural es mutada de tal manera que ya no tenga lugar ninguna regulación y que la expresión de los genes sea aumentada o disminuida. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden estar contenidas en una o varias copias en la construcción artificial de gen.

Ejemplos de promotores útiles son: los promotores de *ddh*, *amy*, *lysC*, *dapA*, *lysA* procedentes de *Corynebacterium glutamicum*, pero también unos promotores gram positivos, tales como los de *SPO2*, tal como se ha descrito en las citas de *Bacillus Subtilis and its Closest Relatives* [*Bacillus Subtilis* y sus parientes más próximos], Sonenshein, Abraham L., Hoch, James A., Losick, Richard; ASM Press, Distrito de Columbia, Washington, y de Patek M. Eikmanns B.J. Patek J. Sahm H. *Microbiology*. 142 1297-309, 1996, o sino también los promotores de *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacIq*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara*, *SP6*, *I-PR-* o *I-PL*, que encuentran uso ventajosamente en bacterias gram negativas. Se prefiere también la utilización de promotores inducibles, tales como p.ej. unos promotores inducibles por la luz y en particular por la temperatura, tal como el promotor de *P<sub>r</sub>Pi*. En principio se pueden utilizar todos los promotores naturales con sus secuencias de regulación. Además de esto, se pueden utilizar ventajosamente también unos promotores sintéticos.

Las mencionadas secuencias reguladoras deben de hacer posible la expresión deliberada de las secuencias de ácidos nucleicos. Esto puede significar, por ejemplo, según sea el organismo anfitrión, que el gen sea expresado o sobreexpresado tan sólo después de una inducción, o que sea expresado y/o sobreexpresado inmediatamente.

Las secuencias o respectivamente los factores reguladoras/es, de manera preferida, pueden influir en este caso negativamente sobre la expresión y disminuirla de este modo. De esta manera, puede efectuarse un debilitamiento en el plano de la transcripción, por ser utilizadas unas débiles señales de transcripción tales como de promotores y/o intensificadores. Junto a esto, también es posible un debilitamiento de la traducción, por ser disminuida por ejemplo la estabilidad del ARNm.

Las secuencias o respectivamente los factores reguladoras/es, de manera preferida, pueden influir en este caso positivamente sobre la expresión y aumentarla o disminuirla de este modo. De esta manera, se puede efectuar un reforzamiento de los elementos reguladores de manera ventajosa en el plano de la transcripción, por ser utilizadas unas fuertes señales de transcripción tales como de promotores y/o intensificadores. Junto a esto, también es posible un reforzamiento de la traducción, por ser mejorada por ejemplo la estabilidad del ARNm.

La producción de un casete de expresión se efectúa mediante fusión de un promotor adecuado, de una adecuada secuencia de Shine-Dalgarno con una secuencia de nucleótidos de *metK* así como con una adecuada señal de terminación. Para esto se utilizan unas habituales técnicas de recombinación y clonación, tales como las que se han descrito por ejemplo en las citas de *Current Protocols in Molecular Biology*, 1993, John Wiley & Sons, Incorporated, New York New York, *PCR Methods* [Métodos de PCR], Gelfand, David H., Innis, Michael A., Sinsky, John J. 1999, Academic Press, Incorporated, California, San Diego, *PCR Cloning Protocols* [Protocolos de clonación por PCR], *Methods in Molecular Biology Ser.*, tomo 192, 2ª ed., Humana Press, New Jersey, Totowa. T. Maniatis. E.F. Fritschy y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como en la cita de T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions* [Experimentos con fusiones de genes], Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en la cita de Ausubel, F.M. y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987).

La construcción artificial de ácido nucleico recombinante o respectivamente la construcción artificial de gen es insertada para realizar la expresión en un organismo anfitrión adecuado, ventajosamente en un vector específico para un anfitrión, que hace posible una expresión óptima de los genes en el anfitrión. Unos vectores son bien conocidos para un experto en la especialidad y se pueden deducir, por ejemplo, de "Cloning Vectors" (Vectores de

clonación) (Pouwels P. H. y colaboradores, coordinador de edición, Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985). Por el concepto de "vectores" se han de entender, aparte de plásmidos, también todos los otros vectores conocidos para un experto en la especialidad, tales como, por ejemplo, fagos, transposones, elementos IS, fásmidos, cósmidos, y un ADN lineal o circular. Estos vectores se pueden replicar autónomamente en el organismo anfitrión o en cromosomas.

Los descritos genes metK son expresados a modo de ejemplo con ayuda de plásmidos episómicos. Como plásmidos se adecuan aquéllos que son replicados en bacterias corineformes. Numerosos vectores plasmídicos conocidos, tales como p.ej. el pZ1 (Menkel y colaboradores, Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), el pEKEx1 (Eikmanns y colaboradores, Gene 102: 93-98 (1991)) o el pHS2-1 (Sonnen y colaboradores, Gene 107: 69-74 (1991)) se basan en los plásmidos crípticos pHM1519, pBL1 o pGA1. Otros vectores plasmídicos, tales como p.ej. el pClik5MCS, SEQ ID NO: 9, o los que se basan en el pCG4 (documento de patente de los EE.UU. US-A 4.489.160) o el pNG2 (Serwold-Davis y colaboradores, FEMS Microbiology Letters 66,119-124 (1990)) o el pAG1 (documento US-A 5.158.891), pueden ser utilizados de igual manera.

Además, también se adecuan aquellos vectores plasmídicos con cuya ayuda se puede usar el procedimiento de la amplificación de genes mediante integración en el cromosoma, tal como ha sido descrito por ejemplo por Remscheid y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132) (1994)) para realizar la duplicación o respectivamente la amplificación del operón de hom-thrB. En el caso de este método, el gen completo es clonado en un vector plasmídico, que se puede replicar en un anfitrión (típicamente en E. coli), pero no en C. glutamicum. Como vectores entran en cuestión, por ejemplo, el pSUP301 (Simon y colaboradores, Bio/Technology 1,784-791 (1983)), el pK18mob o el pK19mob {Schäfer y colaboradores, Gene 145,69-73 (1994)), Bernard y colaboradores, Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), el pEM1 (Schrumpf y colaboradores 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) o el pBGS8 (Spratt y colaboradores, 1986, Gene 41: 337-342). Otros vectores plasmídicos tales como, por ejemplo, el pCLIK5MCS integrativ sacB, SEQ 10 NO:12, se pueden utilizar de igual manera.

El vector plasmídico, que contiene el gen que debe de ser amplificado, se transfiere a continuación mediante transformación a la cepa deseada de C. glutamicum. Unos métodos para la transformación se han descrito, por ejemplo, en las citas de Thierbach y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), de Dunican y Shivnan {Biotechnology 7, 1067-1070 (1989)) y de Tauch y colaboradores (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)).

Los microorganismos se pueden cultivar de una manera continua o discontinua en el procedimiento batch (cultivación por tandas) o en el procedimiento fed batch (procedimiento de afluencia) o en el procedimiento fed batch repeated (procedimiento de afluencia repetida) con el fin de efectuar la producción de productos químicos finos que contienen azufre, en particular de L-metionina. Una recopilación acerca de métodos conocidos de cultivación se encuentra en el libro de texto de Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Técnica de bioprocesos 1. Introducción en la técnica de los bioprocesos] (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y disposiciones periféricas] (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo que se ha de utilizar tiene que satisfacer de un modo adecuado los requisitos planteados por las respectivas cepas. Unas descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981).

Estos medios empleables conforme al invento abarcan habitualmente una o varias fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o elementos trazas.

Unas preferidas fuentes de carbono son azúcares, tales como mono-, di- o polisacáridos. También son unas muy buenas fuentes de carbono, por ejemplo, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, un almidón o una celulosa. También se pueden añadir azúcares a los medios a través de compuestos complejos, tales como melazas, u otros productos secundarios de la refinación de azúcares. Puede ser también ventajoso añadir mezclas de diferentes fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas tales como p.ej. aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos tales como p.ej. ácido palmítico, ácido esteárico o ácido linoleico, alcoholes tales como p.ej glicerol, metanol o etanol, y ácidos orgánicos tales como p.ej. ácido acético o ácido láctico.

Son fuentes de nitrógeno habitualmente unos compuestos nitrogenados orgánicos o inorgánicos o unos materiales que contienen estos compuestos. Unas fuentes de nitrógeno dadas como ejemplos comprenden amoníaco gaseoso o sales de amonio, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes complejas de nitrógeno, tales como agua de maceración de maíz, harina de soja, una proteína de soja, un extracto de levadura, un extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o como una mezcla.

Los compuestos salinos inorgánicos, que pueden estar contenidos en los medios, abarcan las sales de cloruro, fosfato o sulfato con calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, zinc, cobre y hierro.

5 Como fuente de azufre para la producción de metionina se pueden utilizar compuestos inorgánicos que contienen azufre, tales como, por ejemplo, sulfatos, sulfitos, ditionitos, tetratiónatos, tiosulfatos, sulfuros pero también compuestos orgánicos de azufre, tales como mercaptanos y tioles.

10 Como fuente de fósforo se pueden utilizar ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio o hidrógeno-fosfato de dipotasio, o bien las correspondientes sales que contienen sodio.

15 Se pueden añadir agentes formadores de quelatos al medio, con el fin de mantener en solución a los iones de metales. Unos agentes formadores de quelatos especialmente adecuados abarcan dihidroxifenoles, tales como el catecol o el protocatecuato, o ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico.

20 Los medios de fermentación empleados conforme al invento contienen usualmente también otros factores de crecimiento, tales como vitaminas o fomentadores del crecimiento, a los que pertenecen, por ejemplo, biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y las sales proceden frecuentemente de complejos componentes de medios, tales como un extracto de levadura, melazas, agua de maceración de maíz y similares. Al medio de cultivo se le pueden añadir además de esto unas compuestos  
25 precursores adecuados. La composición exacta de los compuestos de los medios depende en gran manera del respectivo experimento y es decidida individualmente para cada caso específico. Una información sobre la optimización de los medios es obtenible a partir del manual "Applied Microbiol. Physiology. A Practical Approach" (coordinadores de edición P.M. Rhodes, P.F. Stanbury. IRL Press (1997) página 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Los medios de crecimiento se pueden obtener también de oferentes comerciales, tales como el Standard 1 (de Merck) o el BHI (acrónimo del inglés "Brain heart infusion" (Infusión de cerebro y corazón), de DIFCO) y similares.

30 Todos los componentes de los medios son esterilizados, o bien por calor (durante 20 min a 1,5 bares y 121°C) o por filtración en condiciones estériles. Los componentes se pueden esterilizar o bien conjuntamente o en caso necesario también por separado. Todos los componentes de los medios pueden estar presentes al comienzo de la cultivación o se pueden añadir facultativamente de un modo continuo o por tandas.

35 La temperatura del cultivo se sitúa normalmente entre 15°C y 45°C, de manera preferida en 25°C hasta 40°C y puede ser mantenida constante o modificada durante el experimento. El valor del pH del medio debería estar situado en el intervalo de 5 a 8,5, de manera preferida en torno a 7,0. El valor del pH para la cultivación se puede controlar durante la cultivación mediante una adición de compuestos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o respectivamente agua amoniacal, o de compuestos de carácter ácido tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para la represión del desarrollo de espuma se pueden emplear agentes antiespumantes, tales como p.ej. ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para la conservación de la estabilidad de los plásmidos, se le pueden añadir al medio unas apropiadas sustancias que actúan de un modo selectivo, por  
40 ejemplo antibióticos. Con el fin de mantener unas condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como por ejemplo aire del medio ambiente. La temperatura del cultivo está situada normalmente en 20°C hasta 45°C y de manera preferida en 25°C hasta 40°C. La cultivación se prosigue durante tanto tiempo hasta que se haya formado una cantidad máxima del producto deseado. Esta meta se alcanza normalmente en el transcurso de 10 horas hasta 160 horas.

45 Los caldos de fermentación que contienen L-metionina, obtenidos de esta manera, tienen usualmente una masa seca de 7,5 a 25 % en peso.

50 Además de ello, también es ventajoso que la fermentación sea llevada a cabo de un modo limitado en cuanto a los azúcares por lo menos al final, pero en particular en el transcurso de por lo menos un 30 % de la duración de la fermentación. Esto quiere decir que durante este período de tiempo la concentración de un azúcar aprovechable en el medio de fermentación es mantenida en  $\geq 0$  hasta 3 g/l, o respectivamente es disminuida.

55 El caldo de fermentación es tratado ulteriormente a continuación. Según sean los requisitos, la biomasa se puede eliminar total o parcialmente a partir del caldo de fermentación mediante ciertos métodos de separación, tales como por ejemplo los de centrifugación, filtración, decantación o una combinación de éstos, o se puede dejar completamente en este caldo.

60 A continuación, el caldo de fermentación se puede espesar o respectivamente concentrar con métodos conocidos, tal como p.ej. con ayuda de un evaporador rotatorio, de un evaporador de capa fina o de un evaporador de película descendente, mediante ósmosis inversa o mediante nanofiltración. Este caldo de fermentación concentrado se puede elaborar a continuación mediante liofilización, desecación por atomización, granulación por atomización o mediante procedimientos de otros tipos.

65 Pero también es posible purificar ulteriormente la L-metionina. Para esto, el caldo que contiene el producto, después de la separación de la biomasa, es sometido a una cromatografía con una resina adecuada, reteniéndose el

producto deseado o las impurezas de manera total o parcial sobre la resina de cromatografía. Estas etapas de cromatografía se pueden repetir en caso necesario, utilizándose las mismas resinas de cromatografía u otras distintas. Un experto en la especialidad está versado en la elección de las resinas de cromatografía que son adecuadas y de su uso máximamente eficaz. El producto purificado se puede concentrar mediante filtración o ultrafiltración y se puede mantener a una temperatura, en la que es máxima la estabilidad del producto.

La identidad y la pureza del/de los compuesto(s) aislado(s) se puede determinar mediante técnicas del estado de la técnica. Éstas abarcan la cromatografía de fase líquida de alto rendimiento (HPLC), procedimientos espectroscópicos, procedimientos de tinción, la cromatografía en capa fina, NIRS (espectroscopia en el infrarrojo próximo), ensayos enzimáticos o ensayos microbiológicos. Estos procedimientos de análisis están recopilados en las citas de Patek y colaboradores (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; de Malakhova y colaboradores (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; y de Schmidt y colaboradores (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70, en la Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry [Enciclopedia de Ulmann de la química Industrial] (1996) tomo A27, VCH: Weinheim, páginas 89-90, páginas 521-540, páginas 540-547, páginas 559-566, 575-581 und páginas 581-587; de Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology [Rutas bioquímicas. un atlas de bioquímica y biología molecular], John Wiley and Sons; y de Fallon, A y colaboradores (1987) Applications of HPLC in Biochemlstry en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology [Aplicaciones de una HPLC en bioquímica en: Técnicas de laboratorio en bioquímica y biología molecular], tomo 17.

El invento se describe seguidamente de manera más detallada con ayuda de los siguientes Ejemplos, que no son restrictivos:

La Figura 1 muestra los resultados de un ensayo radiactivo de metK, que se lleva a cabo con la enzima de tipo silvestre (wt) o respectivamente con el mutante C94A.

**Ejemplo 1**  
Producción del vector pCLiK5MCS

En primer lugar se amplificaron la resistencia a ampicilina y el origen de la replicación del vector pBR322 con los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### SEQ ID NO:1

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCCGGTGTGAAATACCGCACAG-3'

#### SEQ ID NO:2

5'-TCTAGACTCGAGCGGCGCGCCGGCCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTCG-3'

Junto a las secuencias complementarias con respecto al pBR322, el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO:1 contiene en la dirección 5'-3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción SmaI, BamHI, NheI y AclI, y el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO:2 contiene en la dirección 5'-3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción XbaI, XhoI, NotI y DraI. La reacción de PCR se llevó a cabo según el método clásico de Innis y colaboradores (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications [Protocolos para la PCR, una guía de métodos y aplicaciones], Academic Press (1990)) con la polimerasa de PfuTurbo (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.). El fragmento de ADN obtenido, con un tamaño de aproximadamente 2,1 kb, se purificó con el estuche GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. Los extremos romos del fragmento de ADN fueron ligados uno con otro con el estuche Rapid DNA Ligation Kit (de Roche Diagnostics, Mannheim) según los datos del fabricante, y la tanda de ligación se transformó según métodos clásicos, tal como se han descrito en la cita de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor. (1989)), en el seno de E.coli XL-1Blue competentes (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Una selección de células portadoras de plásmidos se efectuó por medio de la siembra en placas sobre un agar LB, que contiene ampicilina (50 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

El ADN de plásmido de un clon individual fue aislado con el estuche Qiaprep Spin Miniprep Kit (de Qiagen, Hilden) según los datos del fabricante, y comprobado a través de una digestión por restricción. El plásmido así obtenido recibe el nombre pCLiK1.

Partiendo del plásmido pWLT1 (Liebl y colaboradores, 1992) como molde para una reacción de PCR, un casete de resistencia a kanamicina se amplificó con los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4.

55

**SEQ ID NO:3:****5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'****SEQ ID NO:4:****5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'**

5 Junto a las secuencias complementarias con respecto al pWLT1, el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO:3 contiene en la dirección 5'-3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción XbaI, SmaI, BamHI, NheI, y el

10 cebador de oligonucleótido SEQ ID NO:4 contiene en la dirección 5'-3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción AscI y NheI. La reacción de PCR se llevó a cabo según el método clásico de Innis y colaboradores (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) con la polimerasa de PfuTurbo (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.). El fragmento de ADN obtenido, con un tamaño de aproximadamente 1,3 kb, se purificó con el estuche GFX<sup>TM</sup>PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. El fragmento de ADN se cortó con las endonucleasas de restricción XbaI y AscI (de New England Biolabs, Beverly, EE.UU.) y a continuación de esto se purificó de nuevo con el estuche GFX<sup>TM</sup>PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. El vector pClik1 fue cortado asimismo con las endonucleasas de restricción XbaI y AscI y desfosforilado con una fosfatasa alcalina (I (de Roche Diagnostics, Mannheim)) según los datos del fabricante. Después de una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, el vector linealizado (con un tamaño de aproximadamente 2,1 kb) se aisló con el GFX<sup>TM</sup>PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con el fragmento de PCR cortado con ayuda del estuche Rapid DNA Ligation Kit (de Roche Diagnostics, Mannheim) según los datos del fabricante y la tanda de ligación se transformó según métodos clásicos, tal como se han descrito en la cita de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989)), en el seno de E.coli XL-1Blue competentes (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Una selección en cuanto a células portadoras de plásmidos se efectuó por medio de la siembra en placas sobre un agar LB, que contiene ampicilina (50 µg/ml) y kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

25 El ADN de plásmido de un clon individual fue aislado con el estuche Qiaprep Spin Miniprep Kit (de Qiagen, Hilden) según los datos del fabricante y comprobado a través de una digestión por restricción. El plásmido así obtenido recibe el nombre pCLiK2.

30 El vector pCLiK2 se cortó con la endonucleasa de restricción DraI (de New England Biolabs Beverly, EE.UU.). Después de una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, un fragmento de vector con un tamaño de aproximadamente 2,3 kb se aisló con el estuche GFX<sup>TM</sup>PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. Este fragmento de vector se volvió a ligar con ayuda del estuche Rapid DNA Ligation Kit (de Roche Diagnostics, Mannheim) según los datos del fabricante, y la tanda de ligación se transformó según métodos clásicos, tal como se han descrito en la cita de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor. (1989)), en el seno de E.coli XL-1Blue competentes (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Una selección en cuanto a células portadoras de plásmidos se efectuó por medio de la siembra en placas sobre un agar LB, que contiene kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

40 El ADN de plásmido de un clon individual fue aislado con el estuche Qiaprep Spin Miniprep Kit (de Qiagen, Hilden) según los datos del fabricante y comprobado a través de una digestión por restricción. El plásmido así obtenido recibe el nombre pCLiK3.

Partiendo del plásmido pWLQ2 (Liebl y colaboradores, 1992) como molde para una reacción de PCR, el origen de la replicación de pHM1519 se amplificó con los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.

**SEQ ID NO:5:****5'-GAGAGGGCGGCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'****SEQ ID NO:6:****5'-GAGAGGGCGGCGCGCTCAAGTCCGGTCAAGCCACGC-3'**

45 Junto a las secuencias complementarias con respecto al pWLQ2, los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 contienen unos sitios de corte para la endonucleasa de restricción NotI. La reacción de PCR se llevó a cabo según el método clásico de Innis y colaboradores (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications,

Academic Press (1990)) con la polimerasa de PfuTurbo (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.). El fragmento de ADN obtenido, con un tamaño de aproximadamente 2,7 kb, se purificó con el estuche GFX<sup>TM</sup>PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. El fragmento de ADN se cortó con la endonucleasa de restricción NotI (de New England Biolabs, Beverly, EE.UU.) y a continuación de esto se purificó de nuevo con el estuche GFX<sup>TM</sup>PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. El vector pClik3 se cortó asimismo con la endonucleasa de restricción NotI y se desfosforiló con una fosfatasa alcalina (I (de Roche Diagnostics, Mannheim) según los datos del fabricante. Después de una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, el vector linealizado (con un tamaño de aproximadamente 2,3 kb) se aisló con el estuche GFX<sup>TM</sup>PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con el fragmento PCR cortado con ayuda del estuche Rapid DNA Ligation Kit (de Roche Diagnostics, Mannheim) según los datos del fabricante, y la tanda de ligación se transformó según métodos clásicos, tal como se han descrito en la cita de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor. (1989)), en el seno de E.coli XL-1Blue competentes (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Una selección en cuanto a células portadoras de plásmidos se efectuó por medio de la siembra en placas sobre un agar LB, que contiene kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

El ADN de plásmido de un clon individual fue aislado con el estuche Qiaprep Spin Miniprep Kit (de Qiagen, Hilden) según los datos del fabricante y comprobado a través de una digestión por restricción. El plásmido así obtenido recibe el nombre pClik5.

Para realizar la ampliación del pClik5 con un sitio de clonación múltiple (MCS, acrónimo del inglés "multiple cloning site") los dos oligonucleótidos sintéticos, que son amplísimamente complementarios, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, que contienen sitios de corte para las endonucleasas de restricción SwaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, Sall, ClaI, BamHI, XbaI y SmaI, se reúnen mediante un calentamiento en común a 95°C y un lento enfriamiento para dar un fragmento de ADN bicatenario.

#### SEQ ID NO:7

5'-TCGAATTTAAATCTCGAGAGGCTGACGTCGGGCCGGTACCACGCGTCATATGACT  
AGTTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTTCTGCGTTAATTAACAATTGGG  
ATCCTCTAGACCCGGGATTTAAAT-3'

#### SEQ ID NO:8:

5'-GATCATTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAGCATC  
GATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAAGTTCATATGACGCGTGGTACCGGGCCCGA  
CGTCAGGCCTCTCGAGATTTAAAT-3'

El vector pClik5 se cortó con las endonucleasas de restricción XhoI y BamHI (de New England Biolabs, Beverly, EE.UU.) y se desfosforiló con una fosfatasa alcalina (I (de Roche Diagnostics, Mannheim)) según los datos del fabricante. Después de una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, el vector linealizado (con un tamaño de aproximadamente 5,0 kb) se aisló con el estuche GFX<sup>TM</sup>PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con el fragmento de PCR cortado con ayuda del estuche Rapid DNA Ligation Kit (de Roche Diagnostics, Mannheim) según los datos del fabricante y la tanda de ligación se transformó según métodos clásicos, tal como se han descrito en la cita de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor. (1989)), en el seno de E.coli XL-1Blue competentes (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Una selección en cuanto a células portadoras de plásmidos se efectuó por medio de la siembra en placas sobre un agar LB, que contiene kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

El ADN de plásmido de un clon individual fue aislado con el estuche Qiaprep Spin Miniprep Kit (de Qiagen, Hilden) según los datos del fabricante y comprobado a través de una digestión por restricción. El plásmido así obtenido recibe el nombre pClik5MCS.

Unas reacciones de secuenciación se llevaron a cabo según Sanger y colaboradores (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciación se separaron y se evaluaron con ayuda del equipo ABI Prism 377 (de PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante pClik5MCS se expone como SEQ ID NO:9.

**Ejemplo 2**

Producción del vector pCLiK5MCS integrativ sacB

- 5 Partiendo del plásmido pk19mob (Schäfer y colaboradores, Gene 145:69-73(1994) como molde para una reacción de PCR se amplificó el gen sacB de *Bacillus subtilis* con los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11.

**SEQ ID NO:10:****5'-GAGAGCGGCCCGCCGATCCTTTTTAACCCATCAC-3'****SEQ ID NO:11:****5'-AGGAGCGGCCCGCCATCGGCATTTTCTTTTGCG-3'**

- 10 Junto a las secuencias complementarias con respecto al pk19mobsac, los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 contienen sitios de corte para la endonucleasa de restricción NotI. La reacción de PCR se llevó a cabo según el método clásico de Innis y colaboradores (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) con la polimerasa de PfuTurbo (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.). El fragmento de ADN obtenido, con un tamaño de aproximadamente 1,9 kb, se purificó con el estuche GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. El fragmento de ADN se cortó con la endonucleasa de restricción NotI (de New England Biolabs, Beverly, EE.UU.) y a continuación se purificó de nuevo con el estuche GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. El vector pCLiK5MCS se cortó asimismo con la endonucleasa de restricción NotI y se desfosforiló con una fosfatasa alcalina I (de Roche Diagnostics, Mannheim) según los datos del fabricante. Después de una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, un fragmento de vector con un tamaño de aproximadamente 2,4 kb se aisló con el estuche GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg) según los datos del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con el fragmento PCR cortado con ayuda del estuche Rapid DNA Ligation Kit (de Roche Diagnostics, Mannheim) según los datos del fabricante y la tanda de ligación se transformó según métodos clásicos, tal como se han descrito en la cita de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor. (1989)), en el seno de *E. coli* XL-1Blue competentes (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Una selección en cuanto a células portadoras de plásmidos se efectuó por medio de la siembra en placas sobre un agar LB, que contiene kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).
- 20
- 25
- 30 El ADN de plásmido de un clon individual fue aislado con el estuche Qiaprep Spin Miniprep Kit (de Qiagen, Hilden) según los datos del fabricante y comprobado a través de una digestión por restricción. El plásmido así obtenido recibe el nombre pCLiK5MCS integrativ sacB.

- 35 Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo según Sanger y colaboradores (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciación se separaron y se evaluaron con ayuda del equipo ABI Prism 377 (de PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante pCLiK5MCS integrativ sacB se expone como SEQ ID NO:12.

**Ejemplo 3**Aislamiento y clonación del gen metK procedente de *C. glutamicum*

- 45 Se preparó un ADN cromosómico procedente de *C. glutamicum* ATCC 13032 según la cita de Tauch y colaboradores (1995) Plasmid 33:168-179 o de Eikmanns y colaboradores (1994) Microbiology 140:1817-1828. Se sintetizaron los siguientes cebadores de oligonucleótidos partiendo de la secuencia de metK procedente de Großmann y colaboradores (2000) FEMS Microbiology Letters 193:99-103:

**SEQ ID NO:13****5'-GAGAGCCCGGGAAGAAGGGCTGCGACCTCCTCAT -3'**

y

**SEQ ID NO:14**

**5'-CTCTCACGCGTCATATGCAGGTGAGGTAACCCCA-3'**

5 Según los métodos clásicos de Innis y colaboradores (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, y mediante empleo de los cebadores de oligonucleótidos mencionados, así como de la polimerasa de Pfu Turbo (de la entidad Stratagene), se amplificó un fragmento de ADN de 1.640 pares de bases procedente del ADN genómico de *C. glutamicum*.

10 El fragmento se cortó con las enzimas de restricción Mlu I y Sma I (de Roche Diagnostics, Mannheim), que se habían introducido a través del cebador de oligonucleótido para PCR, y se separó por electroforesis en gel. A continuación, el fragmento de ADN se purificó a partir de la agarosa con el estuche GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (de Amersham Pharmacia, Freiburg).

15 El vector pCLiK5MCS, SEQ ID NO:9 se cortó asimismo con las enzimas de restricción Sma I y Mlu I y se desfosforiló con una fosfatasa alcalina I (de Roche Diagnostics, Mannheim) según los datos del fabricante. El vector y el fragmento de ADN se ligaron con la ligasa de ADN T4 (de Amersham Pharmacia, Freiburg) y se transformaron según métodos clásicos, tal como se han descrito en Sambrook y colaboradores (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, en el seno de *E.coli* XL-1Blue (de la entidad Stratagene).

20 La producción del ADN de plásmido se llevó a cabo según unos métodos y con unos materiales de la entidad Qiagen. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo según Sanger y colaboradores (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciación se separaron y se evaluaron con ayuda del equipo ABI Prism 377 (de PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

25 El plásmido resultante pCLiK5MCS/metKwt se expone como SEQ ID NO:15.

**Ejemplo 4**

Mutagénesis del gen metK procedente de *C. glutamicum*

30 La mutagénesis dirigida del gen metK procedente de *C. glutamicum* se llevó a cabo con el estuche QuickChange Kit (de la entidad Stratagene) y según los datos del fabricante. La mutagénesis se llevó a cabo en el plásmido pCLiK5MCS/metKwt, SEQ ID NO:15. Para el intercambio de la cisteína 94 procedente de la SEQ ID NO:16 por alanina 94 se sintetizaron los siguientes cebadores de oligonucleótidos.

**SEQ ID NO:17**

**5'- GATTCGACGGACGCACCGCTGGCGTCTCAGTATCCATC-3'**

35 y

**SEQ ID NO:18**

**5'-GATGGATACTGAGACGCCAGCGGTGCGTCCGTCTCGAATC-3'**

40 El empleo de estos cebadores de oligonucleótidos conduce en la SEQ ID NO:15 a un intercambio de los nucleótidos en las posiciones 1.056 (de C por G) y 1.057 (de A por C). El intercambio resultante de aminoácidos Cys94Ala en el gen metK fue confirmado después de la transformación y de la preparación del plásmido, mediante reacciones de secuenciación. El plásmido obtuvo la denominación pCLiK5MCS/metKC94A y se expone como SEQ ID NO:19.

**Ejemplo 5**

45 Ensayo de la SAM sintasa (metK)

50 Unas cepas de *C. glutamicum*, que habían sido transformadas o bien con el plásmido pCLiK5MCS/metKwt, SEQ ID NO:15, o con el plásmido pCLiK5MCS/metKC94A, SEQ ID NO:19, fueron cultivadas en un medio de BHI/glucosa (37 g/l del medio acabado Brain Heart Infusion, de la entidad Difco, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, 4 % de glucosa) a 30°C hasta llegar a una DO<sub>600</sub> de 20. Las células se separaron por centrifugación a 4°C y el sedimento se lavó con una solución fisiológica enfriada de cloruro de sodio. Después de una centrifugación renovada, se resuspendieron 0,25 g de un sedimento húmedo de células con 1 ml de un tampón de disgregación (Tris 50 mM, de pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM) a 4°C. En un aparato Ribolyser de la entidad Hybaid y en tubitos azules de ribolisis de la entidad

Hybaid y con un ajuste de la rotación de 6,0, la suspensión de bacterias se lisó tres veces durante en cada caso 30 segundos. EL material lisado se clarificó mediante una centrifugación durante 45 minutos a 13.000 rpm en una centrifugadora de Eppendorf y el material sobrenadante se diluyó a 1:10 con agua. El contenido de proteínas se determinó según Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254.

5 La actividad enzimática de la SAM sintasa se determinó según Markham, G.D. y colaboradores (1983) Methods in Enzymology 94: 219-222 con las siguientes modificaciones.

10 Unas tandas de reacción de 100 µl con Tris 100 mM, de pH 8,0, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, L-metionina 1,2 mM, ATP 10 mM, 1 µl de <sup>35</sup>S-L-metionina, correspondientemente a 15,15 µCi (de Amersham, SJ204, actividad específica 1 Ci/µmol) y H<sub>2</sub>O hasta 100 ml, se iniciaron con 100 µg de los respectivos materiales lisados de proteínas y se incubaron a 37°C. En los momentos 0, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos se extrajeron 10 µl de partes alícuotas de la tanda de reacción y se detuvieron sobre hielo con 20 µl de EDTA 50 mM.

15 30 µl de la mezcla de reacción detenida se introdujeron en unidades de filtración de fosfocelulosa (de la entidad Pierce, n° 29520) y se separaron por centrifugación a 6.000 rpm en una centrifugadora de Eppendorf durante 1 minuto. El filtro se lavó dos veces con 500 µl de ácido fosfórico 75 mM, y luego se introdujo en un tubito contador con un líquido de escintilación. La radiactividad de la S-adenosil-metionina formada se determinó en un contador de escintilación (de la entidad Beckman).

20 Los resultados de las mediciones se representan en la Figura 1 adjunta.

25 Tomando en cuenta la actividad específica de la L-metionina radiactiva así como la cantidad empleada de proteínas, la tasa de la formación de S-adenosil-metionina se puede determinar a partir del aumento de la radiactividad incorporada por unidad de tiempo. Su unidad se expresa como µmol de S-adenosil-metionina/min\*mg de proteína. Esta tasa se puede comparar entre la enzima de tipo silvestre y la enzima mutante.

### Ejemplo 6

Determinación del título celular de S-adenosil-metionina en *C. glutamicum*

30 Para realizar la determinación del título celular de S-adenosil-metionina en cepas de *C. glutamicum*, que habían sido transformadas o bien con pCLiK5MCS/metKwt (SEQ ID NO:15) o con pCLiK5MCS/metKC94 (SEQ ID NO:19), se procedió de la siguiente manera. Un sedimento celular obtenido tal como en el Ejemplo 5, que se había lavado con una solución fisiológica enfriada con hielo de cloruro de sodio, se resuspendió con ácido tricloroacético (200 µl de TCA por 0,1 g de sedimento húmedo). Después de 5 minutos sobre hielo, la suspensión se clarificó a 4°C y a 13.000 rpm durante 5 min en una centrifugadora de Eppendorf. El contenido de S-adenosil-metionina en el material sobrenadante se determinó mediante una HPLC (en una columna de intercambio de cationes Ionospher 5C, 10 µl de volumen de inyección; agente eluyente: 70 % vol/vol de formiato de amonio 0,2 M, de pH 4,0, 30 % vol/vol de metanol; detección por UV a 260 nm; 40°C; período de tiempo de retención 8,5 min).

40 Tabla 1. Título de S-adenosil-metionina

	mg/l
ATCC 13032 + metK	73,94
ATCC 13032 + metK C94A	47,36

### Ejemplo 7

45 Intercambio del gen metK wt en *C. glutamicum* por metK C94A

50 Para realizar el intercambio alélico del gen metK de tipo silvestre en *C. glutamicum* KFCC10065 por el mutante metK C94A, en primer lugar la secuencia de metK C94A procedente de la SEQ ID NO:19 se clonó en pCLiK5MCS integrativ sacB (SEQ ID NO:12). Para esto, el plásmido pCLiK5MCS/metKC94A (SEQ ID NO:19) se cortó con las endonucleasas de restricción Bgl II y Xho I (de la entidad NEB, Schwalbach). El fragmento obtenido, con un tamaño de 1.962 pares de bases, se purificó tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. El vector pCLiK5MCS integrativ sacB se cortó asimismo con Bgl II y Xho I y se purificó tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. El vector y el fragmento se ligaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 3, y se transformaron en el seno de *E. coli* XL-1Blue. El plásmido se purificó, y fue confirmado después de la secuenciación. El plásmido pCLiK5MCS integrativ sacB/metKC94A obtenido se expone como SEQ ID NO:20.

60 El plásmido pCLiK5MCS integrativ sacB/metKC94A se transformó en el seno de *C. glutamicum* KFCC10065 mediante una electroporación tal como se ha descrito por Liebl y colaboradores (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303. Unas modificaciones del protocolo se han descrito en el documento DE 10046870. La disposición cromosómica del sitio (locus) de metK de unos transformantes individuales se comprobó con métodos clásicos por transferencia de borrón Southern y por hibridación, tal como se ha descrito en la cita de Sambrook y colaboradores (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor.

De esta manera se aseguró que en el caso de los transformantes se trate de aquellos que contienen el plásmido transformado integrado mediante una recombinación homóloga en el sitio (locus) metK. Después del crecimiento de tales colonias durante una noche en unos medios, que no contienen ningún antibiótico, estos transformantes se sembraron luego en placas en un medio de agar CM con sacarosa (sacarosa al 10 %) y se incubaron a 30°C durante 24 horas.

Puesto que el gen sacB, que está contenido en el vector pCLiK5MCS integrativ sacB/metKC94A, transforma a la sacarosa en un producto tóxico, sólo pueden crecer aquellas colonias que han suprimido el gen sacB mediante una segunda etapa homóloga de recombinación entre el gen metK de tipo silvestre y el gen metKC94A mutado. Durante la recombinación homóloga se puede suprimir o bien el gen de tipo silvestre, o el gen mutado en común con el gen sacB. Cuando el gen sacB se elimina en común con el gen de tipo silvestre, resulta un transformante mutado.

Las colonias en crecimiento se entresacaron, se preparó su ADN genómico y el gen metK se analizó con dos métodos. Por una parte, se aprovechó el intercambio de dos nucleótidos, tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. Con ayuda de un cebador de oligonucleótido para PCR específico, que puede diferenciar junto a su extremo 3' entre ambos alelos, y un segundo cebador de oligonucleótido específico para metK, se pudieron generar unos fragmentos diagnósticos de PCR. Por otra parte, en el caso de aproximadamente 100 transformantes se secuenció el sitio (locus) metK después de una amplificación con cebadores de oligonucleótidos para PCR, que se fijan corriente arriba o respectivamente corriente abajo de la mutación. Se obtuvieron varios clones metK mutados. Un tal clon fue designado como KFCC10065metKC94A. La secuencia de aminoácidos del mutante C94A corresponde a la SEQ ID NO:22.

### Ejemplo 8

Producción de metionina con la cepa KFCC10065metKC94A

La cepa KFCC10065metKC94A producida en el Ejemplo 6 se cultivó sobre una placa de agar con un medio BHI (de Difco) durante 2 días a 30°C. Las células que habían crecido se suspendieron en una solución salina desde la placa de agar y se transfirieron al medio II con una DO a 600 nm de 1,5. El medio II tenía la siguiente composición.

#### Medio IIA

0,6 g/l	de $\text{KH}_2\text{PO}_4$
0,4 g/l	de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
25 g/l	de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
40 g/l	de azúcar en bruto
60 g/l	melaza

El medio formulado de esta manera se ajustó con  $\text{NH}_4\text{OH}$  a un pH de 7,8 y fue esterilizado a 120°C durante 30 min.

#### Medio IIB:

0,3 mg/l	de tiamina*HCl
1 mg/l	de biotina
2 mg/l	de $\text{FeSO}_4$
2 mg/l	de $\text{MnSO}_4$
0,1 mg/l	de vitamina B12

El medio IIB fue formulado por separado, esterilizado mediante filtración y añadido al medio IIA. Los dos componentes IIA y IIB establecen en común el medio II.

Del medio II (= IIA+B) en un matraz Erlenmeyer con una capacidad de 100 ml y con 0,5 g de  $\text{CaCO}_3$  esterilizado se reunieron con células de la cepa arriba mencionada, y se incubaron durante 72 h en un aparato sacudidor orbital con 200 rpm a 30°C.

La metionina formada en el caldo de cultivo se determinó con ayuda del método de determinación de aminoácidos de Agilent en una HPLC Agilent 1100 Series LC system. Una derivatización en columna preliminar con orto-ftalaldehído permite la cuantificación de los aminoácidos formados, la separación de la mezcla de aminoácidos tiene lugar en una columna Hypersil AA (de Agilent).

PROTOCOLO de SECUENCIAS

<110> BASF Aktiengesellschaft

5 <120> METK

<130> M/43138

<160> 23

10 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

15 <211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <400> 1

**cccgggatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52**

<210> 2

25 <211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <400> 2

**tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53**

<210> 3

35 <211> 47

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<400> 3

**gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcggga 47**

45 <210> 4

<211> 38

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<400> 4

**gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38**

55 <210> 5

<211> 34

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<400> 5		
		<b>gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgettcg tgaa</b>	<b>34</b>
5	<210> 6		
	<211> 34		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<400> 6		
15		<b>gagagggcgg ccgctcaagt cggcgaagcc acgc</b>	<b>34</b>
	<210> 7		
	<211> 140		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<400> 7		
		<b>tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgcgtca tatgactagt</b>	<b>60</b>
		<b>tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc</b>	<b>120</b>
		<b>tctagaccgg ggatttaaat</b>	<b>140</b>
	<210> 8		
30	<211> 140		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<400> 8		
		<b>gatcatttaa atcccgggtc tagaggatcc caattgtaa ttaacgcaga agagcatcga</b>	<b>60</b>
		<b>tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc</b>	<b>120</b>
		<b>aggcctctcg agatttaaat</b>	<b>140</b>
40	<210> 9		
	<211> 5091		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 383 888 T3

<400> 9

tcgatttaaa	tctcgagagg	cctgacgtcg	ggcccggtag	cacgcgtcat	atgactagtt	60
cggacctagg	gatatcgteg	acatcgatgc	tcttctgegt	taattaacaa	ttgggatcct	120
ctagaccceg	gatttaaate	gctagcgggc	tgctaaagga	agcggaacac	gtagaaagcc	180
agtccgcaga	aacgggtgct	accccgatg	aatgtcagct	actgggctat	ctggacaagg	240
gaaaacgcaa	gcgcaaagag	aaagcaggta	gcttgcaagt	ggcttacatg	gcgatagcta	300
gactgggcgg	ttttatggac	agcaagcgaa	ccggaattgc	cagctggggc	gccctctggt	360
aaggttggga	agccctgcaa	agtaaactgg	atggctttct	tgccgccaag	gatctgatgg	420
cgcaggggat	caagatctga	tcaagagaca	ggatgaggat	cgtttcgcat	gattgaacaa	480
gatggattgc	acgcaggttc	tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	540
gcacaacaga	caatcggctg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggccc	600
ccggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	660
gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgtc	720

ES 2 383 888 T3

actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca 780  
 tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat 840  
 acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 900  
 cgtactcggg tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 960  
 ctgcgcag ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca tggccgacgg cgaggatctc 1020  
 gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct 1080  
 ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggtc 1140  
 acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac 1200  
 ggtatcgccg ctcccgatcc gcagcgcata gccttctata gccttcttga cgagttcttc 1260  
 tgagcggggc tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgcac gcccaacctg ccatcacgag 1320  
 atttcgattc caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg 1380  
 ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg 1440  
 gcgcgcgggc cggcccgggt tgaaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc 1500  
 aggcgetctt ccgcttcttc gctcaactgac tcgctgcgct cggtcgcttcg gctgcggcga 1560  
 gcggtatcag ctcaactcaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1620  
 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgctg 1680  
 ctggcgtttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc acaaaaaatcg acgctcaagt 1740  
 cagaggtggc gaaaccgcac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctcc 1800  
 ctcgctgcgt ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1860  
 tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1920  
 gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctt agcccgaccg ctgcgcctta 1980  
 tccggttaact atcgtcttga gtccaaccgc gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040  
 gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 2100  
 tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgccc tctgctgaag 2160  
 ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaacaac caccgctggt 2220  
 agcggtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 2280  
 gatcctttga tctttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg 2340  
 attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tcttttaaa ggccggccgc 2400  
 ggccgcgcaa agtcccgctt cgtgaaaatt ttcgtgccgc gtgattttcc gccaaaaact 2460

ES 2 383 888 T3

ttaacgaacg ttcgttataa tgggtgcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc 2520  
 gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc 2580  
 gtcgatttaa aaacggtgat cggatTTTTc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca 2640  
 tcacgagact gggccagtgc cgcgagcgc ctagaaactc tcgtggcggga tcttgaggag 2700  
 ctggctgacg agctgctgtc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760  
 atcagttgcg cctactgctg tggcctgatt cctccccggc ctgaccgcg aggacggcgc 2820  
 gcaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc gcagccagcc gcgagcgcgc caacaaacgc 2880  
 cacgccgagg agctggaggc ggctaggctc caaatggcgc tggaaagtgc tccccgagc 2940  
 gaaatTTTtg ccatggctgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgtg 3000  
 gcggtgcccg caggcatgac aaacatcgt aatgccgcgt ttcgtgtgcc gtggccgccc 3060  
 aggacgtgtc agcgcgccca ccacctgcac cgaatcggca gcagcgtcgc gcgtcgaaaa 3120  
 agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180  
 gtgagcggta actcacaggg cgtcggctaa cccccagtc aaacctggga gaaagcgtc 3240  
 aaaaatgact ctagcggatt cacgagacat tgacacaccg gcctggaaat tttccgctga 3300  
 tctgttcgac acccatcccg agctcgcgct gcgatcacgt ggctggacga gcgaagaccg 3360  
 ccgcgaattc ctgcctcacc tgggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt 3420  
 cgccagcgtc tggatcaaag acccggacac ggagaaacac agccgaagt ataccgagtt 3480  
 ggttcaaaat cgcttgcccg gtgccagtat gttgctctga cgcacgcgca gcacgcagcc 3540  
 gtgcttgccc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gcgggaaaat cgagcacgta 3600  
 aaccccgagg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgcc tggaaaaagc gccagcttgg 3660  
 atcggcgtga atccactgag cgggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat 3720  
 gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgctgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg 3780  
 acccgcgttt tcggcgtga ccaggctttt tcacataggc tgagccgtgg ccaactgcact 3840  
 ctccgacgat cccagccgta ccgctggcat gccagcaca atcgcgtgga tcgcctagct 3900  
 gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggcacagaaa aacctaaaa acgctatgag 3960  
 caggagtttt ctagcggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaagca 4020  
 aaagcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcgcg ctgaagcgtc tggagagctg 4080  
 atcagcggcg tccgtgtcct ctggactgct ccagggcgtg ccgccctgga tgagacggct 4140  
 tttcgccacg ctttgactgt gggataccag ttaaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac 4200  
 accaagggtc atcagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaggcggc cggaggaggc 4260

ES 2 383 888 T3

cgtgagcctg atctgccgcc ggactgtgac cgccagacgg attggccgcg acgtgtgcgc 4320  
 ggctacgtcg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380  
 ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440  
 tggaaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcgag aaaaactagc taagtccagt 4500  
 caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcaggttg gtttatgact 4560  
 gttgagggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620  
 tcacgtcaga ccgtgaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cacgaggacg 4680  
 ccgaaagctt cccagtaaat gtgccatctc gtaggcagaa aacggttccc ccgtagggtc 4740  
 tctctcttgg cctcctttct aggtcgggct gattgctctt gaagctctct aggggggctc 4800  
 acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctgcctcgt aagcgcacaa ggactgctcc 4860  
 caaagatctt caaagccact gccgcgactg ccttcgcaaa gccttgcccc gcggaaattt 4920  
 cctccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttcgagagat 4980  
 tggattctta ccgtggaaat tcttcgcaaa aatcgtcccc tgatgcacct tgcgacgttg 5040  
 gcgtcgggtg cgctgggttc gcttggttg accgacttga tcagcggccg c 5091

<210> 10

<211> 33

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<400> 10

**gagagcggcc gccgacccct ttttaacccat cac**

**33**

<210> 11

15

<211> 32

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<400> 11

**aggagcggcc gccatcggca ttttcttttg cg**

**32**

25

<210> 12

<211> 4323

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 383 888 T3

<400> 12

tcgagaggcc	tgacgtcggg	cccgtacca	cgcgtcatat	gactagtctg	gacctagggg	60
tatcgtcgac	atcgatgctc	ttctgcgta	attaacaatt	gggatcctct	agacccggga	120
tttaaategc	tagcgggctg	ctaaaggaag	cggaacacgt	agaaagccag	tccgcagaaa	180
cggtgctgac	cccggatgaa	tgtcagctac	tgggctatct	ggacaagggg	aaacgcaagc	240
gcaaagagaa	agcaggtagc	ttgcagtggg	cttacatggc	gatagctaga	ctgggcggtt	300
ttatggacag	caagcgaacc	ggaattgcc	gctggggcgc	cctctggtaa	ggttgggaag	360
ccctgcaaag	taaactggat	ggctttcttg	ccgccaagga	tctgatggcg	caggggatca	420
agatctgatc	aagagacagg	atgaggatcg	tttcgcatga	ttgaacaaga	tggattgcac	480
gcaggttctc	cggccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	atgactgggc	acaacagaca	540
atcggctgct	ctgatgccgc	cgtgttccgg	ctgtcagcgc	aggggcgccc	ggttcttttt	600
gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	gaactgcagg	acgaggcagc	gcggctatcg	660
tggctggcca	cgacgggctg	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	tgaagcggga	720
agggactggc	tgctattggg	cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	tcaccttgc	780
cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	840
gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcgaag	catcgcacgc	agcagacacg	tactcggatg	900
gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	960
gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgcgcatg	cccgcggcgc	aggatctcgt	cgtgacccat	1020
ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatggtg	gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	1080
tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	1140
gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	cgcttctctg	tgctttacgg	tatcgccgct	1200
cccgattcgc	agcgcacgc	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	agcgggactc	1260
tggggttcga	aatgaccgac	caagcgacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	1320
ccgccgcctt	ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	ggctggatga	1380
tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcccc	cgctagcggc	gcgccggccg	1440

ES 2 383 888 T3

gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500  
gcttcctcgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560  
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620  
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggcgttttcc 1680  
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740  
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800  
cctgttccga cctgccgct taccggatac ctgtccgct ttctccctc gggaaagcgtg 1860  
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat ctgagtcgg ttaggtcgt tcgctccaag 1920  
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgctcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaactat 1980  
cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040  
aggattagca gagcgaggta ttaggcggg gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 2100  
tacggctaca ctagaaggac agtatttgg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc 2160  
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 2220  
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280  
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtaagggat tttggtcatg 2340  
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaaagg ccggcccgcg ccgccatcgg 2400  
cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gtaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460  
ttgacaacag atgtttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacggtgat 2520  
tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580  
ttcgcctgag gtacagcga gtgtgagtaa gtaaaggtta catcgtagg atcaagatcc 2640  
attttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgatg ggccagtaa agaattagaa 2700  
acataacca gcatgtaaat atcgtagac gtaatgccg caatcgcat tttgatccg 2760  
cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt 2820  
tcctctgta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca 2880  
tcgtttagct caatcatacc gagagcgcg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940  
ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000  
ttgttaaata aagattcttc gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaat 3060  
actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgctg 3120  
cctgagctgt agttgcctc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt tttccgctca 3180  
ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240

ES 2 383 888 T3

gatacgttaa cttgtgcagt tgtcagtggt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300  
 gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaagtgg ctgaacctga ccattcttgt 3360  
 gtttggtctt ttaggataga atcatttgca tcgaatttgg cgctgtcttt aaagacgcgg 3420  
 ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tgcgccactt tttgatagaa catgtaaate 3480  
 gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaatagcaa agacgatgtg gtagccgtga 3540  
 tagtttgca cagtgccgtc agcgttttgg aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600  
 tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660  
 tttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720  
 gtttcttat atggcttttg gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780  
 agcagtgccg tagtaaaggt taatactggt gcttgttttg caaactttt gatgttcac 3840  
 gttcatgtct ccttttttat gtactgtgtt agcggctctg ttcttccagc cctcctgttt 3900  
 gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aatatgtaa ggggtgacgc 3960  
 caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020  
 ccgcgcgatt tacttttoga cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactggtct 4080  
 attttctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140  
 actaaaaaat ctatctgttt cttttcatte tctgtatttt ttatagtttc tgttgcatgg 4200  
 gcataaagtt gcctttttta tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260  
 taatagttaa cggcaggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgatttaa 4320  
 atc 4323

<210> 13

5 <211> 34

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<400> 13

gagagcccgg gaagaagggc tgcgacctcc tcat 34

15 <210> 14

<211> 34

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<400> 14

25 ctctcacgcg tcatatgcag gtgaggtaac ccca 34

ES 2 383 888 T3

<210> 15

<211> 6631

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <400> 15

```

cgcgatcatat gcaggtgagg taaccccaaa agaggtaaaa cccgcgccac cgacttttca      60
ggagcgggga cgcgggtttt tgccatgaat ccgaagatac tacatcagat ttttaggcca      120
acttgagggc tgcgcgaagt tcatcaacgc ggtcgatagc ctccaagga aggtccaaat      180
cagtgcgacc aaagtggccg taggcagcag tgtcagcgta gatcggacga agcagatcaa      240
gctcacggat aattgctgct ggacgcaggc caaagacctc caacacggca gcctgaatct      300
gctcgtcgtc caggccttcc ttggtggtgt caaaggtttc aacgtaaagt ccgactggct      360
ttgcgcgtcc aatggcgat gcaacctgaa cttcagcgcg atcagcaagg cctgctgcca      420
cgatgttctt tgctacccaa cgcattggcg atgcagcaga gcggctccacc ttgcttggat      480
cctaccgga gaatgctcca ccaccatggc gagccatgcc accgtaggta tccacgatga      540
tcttgccggc ggtcagacct gcatcaccca tggggccacc cagaatgaag gaacctgaag      600
ggttgatcaa cacggtgatc tcaccggtt cagatcctc aatgcctgcg tctttgatta      660
cccaatcaat gacgtgttcg cgcagttggg tttccaacca tgcacggctc acttctgggt      720
cgtgctgggt ggagatgaca acggtatcca ggtggctagg gcggtcttgc gcatcgtatg      780
cgaaggtgac ctgggttttt ccgtctggac gcaggtgagg aacgatgccc tctttacgaa      840
cctgggtcag acgacgtgac agtcggtgcg ccaacgcgat aggaagaggc atgtactctt      900
cggtttcgtt ggtggcgtag ccgaacatca ggccctggtc gccagcacct gcgcggtcgt      960
cttcttcaac gtcgccggtg gtgcgggctt cgtcggagtt atccacgccg tcagcgattt     1020
cctgggactg ctcaccgatg gatactgaga cgccacaggt gcgtccgctc aatccaacct     1080
cagaggagtt gaatccgatt tcgatgagct tgttgccggc taattgaggg atctctacgt     1140

```

ES 2 383 888 T3

aagcgcctggg acggacctcg ccaacaacat ggacgattcc ggtggtgacc acagtttcca 1200  
ctgcgacgcg cgactgcgga tctttttcga gcagcgcgtc caaaatggta tcggaaatag 1260  
catcacatat tttgtctgga tgccctcag ttacagattc actggtgaac aaacggacgg 1320  
cggttggctg agccacaaat acccttcttt cgaagaagtt gagaataaat agtcttaaat 1380  
acaaaaaacc aatatagacc aagctgtcta aaactgcaat gtcagtggtc tagctggatt 1440  
tttctagact tcgcgatacg ccagtgccgc gtcccaaatt tgcgcagcaa cctcgatttt 1500  
gctgccgtgc tccacatcga ctaccccacc gtgagcatcc aaaatccagc cctcattgtg 1560  
cttttgccca aacactttgc ccatgcccac ctcatcac atgaggaggt cgcagccctt 1620  
cttcccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag 1680  
tccgcagaaa cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaagggga 1740  
aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1800  
ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcc a gctggggcgc cctctggtaa 1860  
ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg 1920  
caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcata tgaacaaga 1980  
tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 2040  
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc 2100  
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 2160  
gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac 2220  
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 2280  
tcacctgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatc 2340  
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcga aa catcgcacg agcgagcacg 2400  
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2460  
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt 2520  
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggt gaaaatggcc gcttttctgg 2580  
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac 2640  
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 2700  
tatcgcgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttctctg 2760  
agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2820  
ttcgattcca ccgccgctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2880  
ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc 2940

ES 2 383 888 T3

gcgcccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 3000  
 gcgctcttcc gcttccctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 3060  
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatcag gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 3120  
 aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa gcccaggaac cgtaaaaagg ccgctgttgc 3180  
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3240  
 gaggtggcga aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3300  
 cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgect ttctcccttc 3360  
 ggggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcaagtccg tgtaggtcgt 3420  
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgcttatac 3480  
 cggtaaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3540  
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 3600  
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 3660  
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3720  
 cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 3780  
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 3840  
 tttggctatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg 3900  
 ccgcgcaaag tcccgttccg tgaaaatfff cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt 3960  
 aacgaacggt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga 4020  
 atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt 4080  
 cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgcagcatc 4140  
 acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct 4200  
 ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4260  
 cagttgcgcc tactgcgggtg gcctgattcc tccccggcct gaccgcgag gacggcgcgc 4320  
 aaaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca 4380  
 cgccgaggag ctggaggcgg ctaggctcga aatggcgctg gaagtgcgct ccccgagcga 4440  
 aattttggcc atggctgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4500  
 ggtgcccgca ggcatgacaa acatcgtaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag 4560  
 gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag 4620  
 cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatggtg aacgccccgt 4680

ES 2 383 888 T3

gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgctcaa 4740  
 aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgac 4800  
 tgttcgacac ccatcccagag ctccgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4860  
 gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4920  
 ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat accgagttgg 4980  
 ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 5040  
 gcttgctctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 5100  
 ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgtg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat 5160  
 cggcgtgaat ccaactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcatctgac cggtgtatgc 5220  
 cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5280  
 ccgcgttttc ggcgctgacc aggcttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5340  
 ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5400  
 tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa ctaaaaaaac gctatgagca 5460  
 ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaaagcaaa 5520  
 agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgcctg gaagcgtctg gagagctgat 5580  
 cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgtgcc gcccgtgatg agacggcttt 5640  
 tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5700  
 caagggatcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggctc gagggaggccg 5760  
 tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5820  
 ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5880  
 gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggg aaaaaggccg cagaacgctg 5940  
 gaaagaccca aacagtgagt acgcccagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 6000  
 acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggg ttatgactgt 6060  
 tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 6120  
 acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaactcca cgaggacgcc 6180  
 gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggtctc 6240  
 tctcttggcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac 6300  
 accataggca gataacgttc cccaccggct cgctctgtaa gcgcacaagg actgctccca 6360  
 aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6420  
 tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttcttcc accctaaatt cgagagattg 6480

ES 2 383 888 T3

gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc 6540  
 gtcggtgccg ctggttgccg ttggcttgac cgacttgatc agcggccgct cgatttaaat 6600  
 ctcgagagggc ctgacgtcgg gcccgggtacc a 6631

<210> 16

5 <211> 407

<212> PRT

10 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 16

Val	Ala	Gln	Pro	Thr	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Val	Thr
1				5					10					15	
Glu	Gly	His	Pro	Asp	Lys	Ile	Cys	Asp	Ala	Ile	Ser	Asp	Thr	Ile	Leu
			20					25					30		
Asp	Ala	Leu	Leu	Glu	Lys	Asp	Pro	Gln	Ser	Arg	Val	Ala	Val	Glu	Thr
		35					40					45			
Val	Val	Thr	Thr	Gly	Ile	Val	His	Val	Val	Gly	Glu	Val	Arg	Thr	Ser
	50					55					60				
Ala	Tyr	Val	Glu	Ile	Pro	Gln	Leu	Val	Arg	Asn	Lys	Leu	Ile	Glu	Ile
65					70					75				80	
Gly	Phe	Asn	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Phe	Asp	Gly	Arg	Thr	Cys	Gly	Val
				85					90					95	
Ser	Val	Ser	Ile	Gly	Glu	Gln	Ser	Gln	Glu	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Asp
			100					105					110		
Asn	Ser	Asp	Glu	Ala	Arg	Thr	Asn	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asp	Asp	Arg
		115					120					125			
Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	Gln	Gly	Leu	Met	Phe	Gly	Tyr	Ala	Thr	Asn	Glu
	130					135					140				
Thr	Glu	Glu	Tyr	Met	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Leu	Ala	His	Arg	Leu	Ser
145					150					155					160

Arg Arg Leu Thr Gln Val Arg Lys Glu Gly Ile Val Pro His Leu Arg  
 165 170 175

Pro Asp Gly Lys Thr Gln Val Thr Phe Ala Tyr Asp Ala Gln Asp Arg  
 180 185 190

Pro Ser His Leu Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln His Asp Pro Glu  
 195 200 205

Val Asp Arg Ala Trp Leu Glu Thr Gln Leu Arg Glu His Val Ile Asp  
 210 215 220

Trp Val Ile Lys Asp Ala Gly Ile Glu Asp Leu Ala Thr Gly Glu Ile  
 225 230 235 240

Thr Val Leu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Phe Ile Leu Gly Gly Pro Met  
 245 250 255

Gly Asp Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly  
 260 265 270

Gly Met Ala Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser  
 275 280 285

Lys Val Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn  
 290 295 300

Ile Val Ala Ala Gly Leu Ala Asp Arg Ala Glu Val Gln Val Ala Tyr  
 305 310 315 320

Ala Ile Gly Arg Ala Lys Pro Val Gly Leu Tyr Val Glu Thr Phe Asp  
 325 330 335

Thr Asn Lys Glu Gly Leu Ser Asp Glu Gln Ile Gln Ala Ala Val Leu  
 340 345 350

Glu Val Phe Asp Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Glu Leu Asp Leu  
 355 360 365

Leu Arg Pro Ile Tyr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg  
 370 375 380

Thr Asp Leu Asp Leu Pro Trp Glu Ala Ile Asp Arg Val Asp Glu Leu  
 385 390 395 400

**Arg Ala Ala Leu Lys Leu Ala**  
**405**

<210> 17

5 <211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <400> 17

**gattcgacgg acgcaccgct ggcgtctcag tatccatc** **38**

<210> 18

15 <211> 38

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<400> 18

**gatggatact gagacgccag cgggtgcgtcc gtcgaatc** **38**

25 <210> 19

<211> 6631

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<400> 19

**cgcgatcatat gcaggtgagg taacccccaaa agaggtaaaa cccgcgccac cgacttttca** **60**

**ggagcgggga cgcgggtttt tgccatgaat ccgaagatac tacatcagat ttttaggcca** **120**

**acttgagggc tgcgcgaagt tcatcaacgc ggtcgatagc ctccaagga aggtccaaat** **180**

**cagtgcgacc aaagtggccg taggcagcag tgtcagcgta gatcggacga agcagatcaa** **240**

**gctcacggat aattgctgct ggacgcaggt caaagacctc caacacggca gcctgaatct** **300**

**gctcgtcgtc caggccttcc ttggtggtgt caaaggtttc aacgtaaagt ccgactggct** **360**

**ttgcgcgtcc aatggcgtat gcaacctgaa cttcagcgcg atcagcaagg cctgctgcca** **420**

35

ES 2 383 888 T3

cgatgttctt tgctacccaa cgcattggcgt atgcagcaga gcggtccacc ttgcttggat 480  
 ccttaccgga gaatgctcca ccaccatggc gagccatgcc accgtaggta tccacgatga 540  
 tcttgccggc ggtcagacc gcattcacca tggggccacc cagaatgaag gaacctgaag 600  
 ggttgatcaa cacggtgatc tcaccggttg ccagatcctc aatgcctgcg tctttgatta 660  
 cccaatcaat gacgtgttcg cgcagttggg tttccaacca tgcacgggtca acttctgggt 720  
 cgtgctgggt ggagatgaca acggtatcca ggtggctagg gcggtcttgc gcattgatg 780  
 cgaaggtgac ctgggttttt ccgtctggac gcaggtgagg aacgatgcc tctttacgaa 840  
 cctgggtcag acgacgtgac agtcggtgcg ccaacgcgat aggaagaggc atgtactctt 900  
 cggtttcggt ggtggcgtag ccgaacatca ggccttggc gccagcacct gcgcggctgt 960  
 cttcttcaac gtcgccgttg gtgcgggctt cgtcggagtt atccacgccg tcagcgattt 1020  
 cctgggactg ctaccgatg gatactgaga cgcagcggg gcgtccgtcg aatccaacct 1080  
 cagaggagtt gaatccgatt tcgatgagct tgttgccgac taattgaggg atctctacgt 1140  
 aagcgtggt acggacctcg ccaacaacat ggacgattcc ggtggtgacc acagtttcca 1200  
 ctgcgacgcg cactgcgga tctttttcga gcagcgcgtc caaatggta tcggaaatag 1260  
 catcacatat tttgtctgga tgtccctcag ttacagattc actggtgaac aaacggacgg 1320  
 cggttggctg agccacaaat acccttcttt cgaagaagtt gagaataaat agtcttaaat 1380  
 acaaaaaacc aatatagacc aagctgtcta aaactgcaat gtcagtggc tagctggatt 1440  
 tttctagact tcgcgatacg ccagtgccgc gtcccaaatt tgcgcagcaa cctcgatttt 1500  
 gctgccgtgc tccacatcga ctacccacc gtgagcatcc aaaatccagc cctcattgtg 1560  
 cttttgcca aacactttgc ccatgccac ctattacac atgaggaggt cgcagccctt 1620  
 cttcccggga tttaaactcg tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag 1680  
 tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaagga 1740  
 aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1800  
 ctgggcccgtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1860  
 ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg 1920  
 caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcata ttgaacaaga 1980  
 tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 2040  
 acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttcggg ctgtcagcgc aggggcgccc 2100  
 ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 2160  
 gcggctatcg tggctggcca cgacgggctt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac 2220

ES 2 383 888 T3

tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 2280  
 tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2340  
 gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg 2400  
 tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2460  
 cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcgatg cccgacggcg aggatctcgt 2520  
 cgtgacctat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg 2580  
 attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 2640  
 ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttctctg tgetttacgg 2700  
 tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 2760  
 agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2820  
 ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2880  
 ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc 2940  
 gcgcccggccg gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 3000  
 gcgctcttcc gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcggtcggc tgcggcgagc 3060  
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 3120  
 aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgc 3180  
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3240  
 gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3300  
 cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgctt ttctccctc 3360  
 gggaaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt 3420  
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcaacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc 3480  
 cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3540  
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 3600  
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 3660  
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3720  
 cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 3780  
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 3840  
 tttggctatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcg 3900  
 ccgcgcaaag tcccgttcg tgaaaattht cgtgccgctg gatthtccgc caaaaacttht 3960

ES 2 383 888 T3

aacgaacggt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga 4020  
 atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt 4080  
 cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc 4140  
 acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct 4200  
 ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcg aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4260  
 cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag gacggcgcgc 4320  
 aaaatattgc tcagatgctg gtctgtccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca 4380  
 cgccgaggag ctggaggcgg ctaggctgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4440  
 aattttggcc atggctgca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4500  
 ggtgcccgca ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag 4560  
 gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag 4620  
 cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatggtg aacgccccgt 4680  
 gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgtcaa 4740  
 aatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgac 4800  
 tgttcgacac ccattcccag ctccgcctgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4860  
 gcaattcct cgtcacctg ggccagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4920  
 ccagcgttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat accgagttgg 4980  
 ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 5040  
 gcttgctctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 5100  
 ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgtg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat 5160  
 cggcgtgaat ccaactgagc ggaaatgcca gctcatctgg ctattgatc cgggtgatgc 5220  
 cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5280  
 ccgcgttttc ggcgtgacc aggetttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5340  
 ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5400  
 tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5460  
 ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5520  
 agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgcgcgt gaagcgtctg gagagctgat 5580  
 cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgtgcc gcccgatg agacggcttt 5640  
 tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgc taaaagacac 5700  
 caagggatcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgtc caggcggctc gaggaggccg 5760

ES 2 383 888 T3

tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggcccgac gtgtgcgcg 5820  
 ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5880  
 gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg 5940  
 gaaagaccca aacagtgagt acgcccgagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 6000  
 acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggg ttatgactgt 6060  
 tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 6120  
 acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaactcca cgaggacgcc 6180  
 gaaagcttcc cagtaaagt gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggctctc 6240  
 tctcttggcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac 6300  
 accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca 6360  
 aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcaagc cttgccccgc ggaaatttc 6420  
 tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttcttcc accctaaatt cgagagattg 6480  
 gattcttacc gtggaaatc ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc 6540  
 gtcggtgccg ctggttgcgc ttggttgac cgacttgatc agcggccgct cgatttaaat 6600  
 ctcgagaggc ctgacgtcgg gcccggtacc a 6631

<210> 20

5 <211> 5863

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<400> 20

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gcaggtgagg taaccccaaa 60  
 agaggtaaaa cccgcgccac cgacttttca ggagcgggga cgcgggtttt tgccatgaat 120  
 ccgaagatac tacatcagat ttttaggcca acttgagggc tgcgcaagc tcatcaacgc 180  
 ggtcgatagc ctccaagga aggtccaaat cagtgcgacc aaagtggccg taggcagcag 240  
 tgtcagcgta gatcggacga agcagatcaa gctcacggat aattgctgct ggacgcaggt 300  
 caaagacctc caacacggca gcctgaatct gctcgtcgtc caggccttcc ttgttgggtg 360  
 caaaggtttc aacgtaaagt ccgactggct ttgcgcgtcc aatggcgtat gcaacctgaa 420  
 cttcagcgcg atcagcaagg cctgctgcca cgatgttctt tgctacccaa cgcattggcgt 480

ES 2 383 888 T3

atgcagcaga gcggtccacc ttgcttggat ccttaccgga gaatgctcca ccaccatggc 540  
 gagccatgcc accgtaggta tccacgatga tcttgccggc ggtcagaccc gcatcaccca 600  
 tggggccacc cagaatgaag gaacctgaag ggttgatcaa cacggtgatc tcaccggttg 660  
 ccagatcctc aatgcctgcg tctttgatta cccaatcaat gacgtgttcg cgcagttggg 720  
 tttccaacca tgcacggtea acttctgggt cgtgctgggt ggagatgaca acggtatcca 780  
 ggtggctagg gcggtcttgc gcatcgtatg cgaaggtagc ctgggttttt ccgtctggac 840  
 gcaggtgagg aacgatgcc tctttacgaa cctgggtcag acgacgtgac agtcggtgcg 900  
 ccaacgcgat aggaagaggc atgtactctt cggtttcggt ggtggcgtag ccgaacatca 960  
 ggccctggtc gccagcacct gcgcggtcgt cttcttcaac gtcgccgttg gtgcccgtt 1020  
 cgtcggagtt atccacgccc tcagcgattt cctgggactg ctcaccgatg gatactgaga 1080  
 cgccagcggg gcgtccgctc aatccaacct cagaggagt gaatccgatt tcgatgagct 1140  
 tgttgccgac taattgaggg atctctacgt aagcgcgtgt acggacctcg ccaacaacat 1200  
 ggacgattcc ggtggtgacc acagtttcca ctgacgacgc cgactgcgga tctttttcga 1260  
 gcagcgcgtc caaatggta tcggaaatag catcacatat tttgtctgga tgtccctcag 1320  
 ttacagatcc actggtgaac aaacggacgg cggttggctg agccacaaat acccttcttt 1380  
 cgaagaagtt gagaataaat agtcttaaat acaaaaaacc aatatagacc aagctgtcta 1440  
 aaactgcaat gtcagtggtc tagctggatt tttctagact tcgcgatacg ccagtgccgc 1500  
 gtcccaaatt tgcgcagcaa cctcgatttt gctgccgtgc tccacatcga ctaccccacc 1560  
 gtgagcatcc aaaatccagc cctcatgtg cttttgcca aacactttgc ccatgcccac 1620  
 ctcattacac atgaggaggt cgcagccctt cttcccggga tttaaatcgc tagcgggctg 1680  
 ctaaaggaag cgaacacgt agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa 1740  
 tgtcagctac tgggctatct ggacaagggg aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc 1800  
 ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc 1860  
 ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat 1920  
 ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agatctgatc aagagacagg 1980  
 atgaggatcg tttcgcata ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg 2040  
 ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc 2100  
 cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg 2160  
 tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggtggcca cgacgggcgt 2220  
 tccttgccga gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg 2280

ES 2 383 888 T3

cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcadc tcaccttgcct cctgccgaga aagtatccat 2340  
 catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca 2400  
 ccaagcgaag catcgcacg agcagacacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgaatca 2460  
 ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa 2520  
 ggcgcgcacg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa 2580  
 tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc 2640  
 ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga 2700  
 atgggctgac cgcttcctcg tgetttacgg tategccgct cccgattcgc agcgcacgc 2760  
 cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac 2820  
 caagcgcgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg 2880  
 ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc 2940  
 atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca 3000  
 cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc 3060  
 gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc 3120  
 gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa 3180  
 ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcggttgc ggcgtttttc cataggctcc gccccctga 3240  
 cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag gactataaag 3300  
 ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctggtccga cctgcccgt 3360  
 taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaaagcgtg gcgctttctc atagctcacg 3420  
 ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc 3480  
 ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata ccgtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt 3540  
 aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta 3600  
 tgtaggcggc gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac 3660  
 agtatttggc atctgcgctc tgcgtaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc 3720  
 ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag ccggtggttt tttgtttgca agcagcagat 3780  
 tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc tttctacgg ggtctgacgc 3840  
 tcagtggaac gaaaactcac gtttaaggat tttggctatg agattatcaa aaaggatctt 3900  
 cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg cattttcttt tgcgttttta 3960  
 tttgttaact gtttaattgc cttgttcaag gatgctgtct ttgacaacag atgttttctt 4020

ES 2 383 888 T3

gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat tgtttgtctg cgtagaatcc 4080  
tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct ttcgcttgag gtacagcgaa 4140  
gtgtgagtaa gtaaaggтта catcgttagg atcaagatcc atttttaaca caaggccagt 4200  
tttgttcagc ggcttgatg ggccagttaa agaattagaa acataaccaa gcatgtaaat 4260  
atcgttagac gtaatgccgt caatcgtcac ttttgatccg cgggagtcag tgaacaggta 4320  
ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt tcatctgtta ctgtgttaga 4380  
tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca tcgtttagct caatcatacc 4440  
gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg ctttgcagaa gtttttgact 4500  
ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct ttgttaaata aagattcttc 4560  
gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaat actaagtatt tgtggccttt 4620  
atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgtcg cctgagctgt agttgccttc 4680  
atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca ccgtcaaaga ttgatttata 4740  
atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct gatacgtaa cttgtgcagt 4800  
tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca gtgtagaata aacggatttt 4860  
tccgtcagat gtaaagtggg ctgaacctga ccattcttgt gtttggctct ttaggataga 4920  
atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg ccagcgtttt tccagctgtc 4980  
aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaate gatgtgtcat ccgcattttt 5040  
aggatctccg gctaatagcaa agacgatgtg gtagccgtga tagtttgca cagtgccttc 5100  
agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct tttgcagaag agatattttt 5160  
aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca tttttttgct gttcagggat 5220  
ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgat gtttccttat atggcttttg 5280  
gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc agcagtgcgg tagtaaaggt 5340  
taatactggt gcttgttttg caaacttttt gatgttcate gttcatgtct ccttttttat 5400  
gtactgtgtt agcggctctgc ttcttcagc cctcctgttt gaagatggca agttagttac 5460  
gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc caaagtatac actttgcctt 5520  
ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac ccgcgcgatt tacttttcga 5580  
cctcattcta ttagactctc gtttgattg caactggtct attttcctct tttgtttgat 5640  
agaaaatcat aaaaggattt gcgactacg ggccataaga actaaaaaat ctatctgttt 5700  
cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcatgg gcataaagtt gcctttttaa 5760  
tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa taatagttaa cggcaggtat 5820

atgtgatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgatttaa atc

5863

<210> 21

5 <211> 1224

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> CDS

<222> (1) .. (1224)

<223>

20 <400> 21

Met	<del>Met</del>	gtg gct cag cca acc gcc gtc cgt ttg ttc acc agt gaa tct gta act	48
		Ala Ala Gln Pro Thr Ala Val Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr	
		1 5 10 15	
		gag gga cat cca gac aaa ata tgt gat gct att tcc gat acc att ttg	96
		Glu Gly His Pro Asp Lys Ile Cys Asp Ala Ile Ser Asp Thr Ile Leu	
		20 25 30	
		gac gcg ctg ctc gaa aaa gat ccg cag tcg cgc gtc gca gtg gaa act	144
		Asp Ala Leu Leu Glu Lys Asp Pro Gln Ser Arg Val Ala Val Glu Thr	
		35 40 45	
		gtg gtc acc acc gga atc gtc cat gtt gtt ggc gag gtc cgt acc agc	192
		Val Val Thr Thr Gly Ile Val His Val Val Gly Glu Val Arg Thr Ser	
		50 55 60	
		gct tac gta gag atc cct caa tta gtc cgc aac aag ctc atc gaa atc	240
		Ala Tyr Val Glu Ile Pro Gln Leu Val Arg Asn Lys Leu Ile Glu Ile	
		65 70 75 80	
		gga ttc aac tcc tct gag gtt gga ttc gac gga cgc acc gct ggc gtc	288
		Gly Phe Asn Ser Ser Glu Val Gly Phe Asp Gly Arg Thr Ala Gly Val	
		85 90 95	
		tca gta tcc atc ggt gag cag tcc cag gaa atc gct gac ggc gtg gat	336
		Ser Val Ser Ile Gly Glu Gln Ser Gln Glu Ile Ala Asp Gly Val Asp	
		100 105 110	
		aac tcc gac gaa gcc cgc acc aac ggc gac gtt gaa gaa gac gac cgc	384
		Asn Ser Asp Glu Ala Arg Thr Asn Gly Asp Val Glu Glu Asp Asp Arg	
		115 120 125	
		gca ggt gct ggc gac cag gcc ctg atg ttc ggc tac gcc acc aac gaa	432
		Ala Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asn Glu	

ES 2 383 888 T3

130	135	140	
acc gaa gag tac atg cct ctt cct atc gcg ttg gcg cac cga ctg tca			480
Thr Glu Glu Tyr Met Pro Leu Pro Ile Ala Leu Ala His Arg Leu Ser			
145	150	155	160
cgt cgt ctg acc cag gtt cgt aaa gag ggc atc gtt cct cac ctg cgt			528
Arg Arg Leu Thr Gln Val Arg Lys Glu Gly Ile Val Pro His Leu Arg			
	165	170	175
cca gac gga aaa acc cag gtc acc ttc gca tac gat gcg caa gac cgc			576
Pro Asp Gly Lys Thr Gln Val Thr Phe Ala Tyr Asp Ala Gln Asp Arg			
	180	185	190
cct agc cac ctg gat acc gtt gtc atc tcc acc cag cac gac cca gaa			624
Pro Ser His Leu Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln His Asp Pro Glu			
	195	200	205
gtt gac cgt gca tgg ttg gaa acc caa ctg cgc gaa cac gtc att gat			672
Val Asp Arg Ala Trp Leu Glu Thr Gln Leu Arg Glu His Val Ile Asp			
	210	215	220
tgg gta atc aaa gac gca ggc att gag gat ctg gca acc ggt gag atc			720
Trp Val Ile Lys Asp Ala Gly Ile Glu Asp Leu Ala Thr Gly Glu Ile			
	225	230	235
acc gtg ttg atc aac cct tca ggt tcc ttc att ctg ggt ggc ccc atg			768
Thr Val Leu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Phe Ile Leu Gly Gly Pro Met			
	245	250	255
ggt gat gcg ggt ctg acc ggc cgc aag atc atc gtg gat acc tac ggt			816
Gly Asp Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly			
	260	265	270
ggc atg gct cgc cat ggt ggt gga gca ttc tcc ggt aag gat cca agc			864
Gly Met Ala Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser			
	275	280	285
aag gtg gac cgc tct gct gca tac gcc atg cgt tgg gta gca aag aac			912
Lys Val Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn			
	290	295	300
atc gtg gca gca ggc ctt gct gat cgc gct gaa gtt cag gtt gca tac			960
Ile Val Ala Ala Gly Leu Ala Asp Arg Ala Glu Val Gln Val Ala Tyr			
	305	310	315
gcc att gga cgc gca aag cca gtc gga ctt tac gtt gaa acc ttt gac			1008
Ala Ile Gly Arg Ala Lys Pro Val Gly Leu Tyr Val Glu Thr Phe Asp			
	325	330	335
acc aac aag gaa ggc ctg agc gac gag cag att cag gct gcc gtg ttg			1056
Thr Asn Lys Glu Gly Leu Ser Asp Glu Gln Ile Gln Ala Ala Val Leu			
	340	345	350
gag gtc ttt gac ctg cgt cca gca gca att atc cgt gag ctt gat ctg			1104
Glu Val Phe Asp Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Glu Leu Asp Leu			
	355	360	365
ctt cgt ccg atc tac gct gac act gct gcc tac ggc cac ttt ggt cgc			1152

ES 2 383 888 T3

Leu Arg Pro Ile Tyr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg  
 370 375 380  
 act gat ttg gac ctt cct tgg gag gct atc gac cgc gtt gat gaa ctt 1200  
 Thr Asp Leu Asp Leu Pro Trp Glu Ala Ile Asp Arg Val Asp Glu Leu  
 385 390 395 400  
 cgc gca gcc ctc aag ttg gcc taa 1224  
 Arg Ala Ala Leu Lys Leu Ala  
 405

<210> 22

<211> 407

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<400> 22

Met Ala Gln Pro Thr Ala Val Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr  
 1 5 10 15

Glu Gly His Pro Asp Lys Ile Cys Asp Ala Ile Ser Asp Thr Ile Leu  
 20 25 30

Asp Ala Leu Leu Glu Lys Asp Pro Gln Ser Arg Val Ala Val Glu Thr  
 35 40 45

Val Val Thr Thr Gly Ile Val His Val Val Gly Glu Val Arg Thr Ser  
 50 55 60

Ala Tyr Val Glu Ile Pro Gln Leu Val Arg Asn Lys Leu Ile Glu Ile  
 65 70 75 80

Gly Phe Asn Ser Ser Glu Val Gly Phe Asp Gly Arg Thr Ala Gly Val  
 85 90 95

Ser Val Ser Ile Gly Glu Gln Ser Gln Glu Ile Ala Asp Gly Val Asp  
 100 105 110

Asn Ser Asp Glu Ala Arg Thr Asn Gly Asp Val Glu Glu Asp Asp Arg  
 115 120 125

Ala Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asn Glu  
 130 135 140

ES 2 383 888 T3

Thr Glu Glu Tyr Met Pro Leu Pro Ile Ala Leu Ala His Arg Leu Ser  
 145 150 155 160

Arg Arg Leu Thr Gln Val Arg Lys Glu Gly Ile Val Pro His Leu Arg  
 165 170 175

Pro Asp Gly Lys Thr Gln Val Thr Phe Ala Tyr Asp Ala Gln Asp Arg  
 180 185 190

Pro Ser His Leu Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln His Asp Pro Glu  
 195 200 205

Val Asp Arg Ala Trp Leu Glu Thr Gln Leu Arg Glu His Val Ile Asp  
 210 215 220

Trp Val Ile Lys Asp Ala Gly Ile Glu Asp Leu Ala Thr Gly Glu Ile  
 225 230 235 240

Thr Val Leu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Phe Ile Leu Gly Gly Pro Met  
 245 250 255

Gly Asp Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly  
 260 265 270

Gly Met Ala Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser  
 275 280 285

Lys Val Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn  
 290 295 300

Ile Val Ala Ala Gly Leu Ala Asp Arg Ala Glu Val Gln Val Ala Tyr  
 305 310 315 320

Ala Ile Gly Arg Ala Lys Pro Val Gly Leu Tyr Val Glu Thr Phe Asp  
 325 330 335

Thr Asn Lys Glu Gly Leu Ser Asp Glu Gln Ile Gln Ala Ala Val Leu  
 340 345 350

Glu Val Phe Asp Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Glu Leu Asp Leu  
 355 360 365

Leu Arg Pro Ile Tyr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg  
 370 375 380

Thr Asp Leu Asp Leu Pro Trp Glu Ala Ile Asp Arg Val Asp Glu Leu  
 385 390 395 400

Arg Ala Ala Leu Lys Leu Ala  
 405

- <210> 23
- 5 <211> 9
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <221> Característica variada
- <222> (2) .. (2)
- 20 <223> Xaa = Phe ó Tyr
- <220>
- 25 <221> Característica variada
- <222> (3) .. (3)
- <223> Xaa = Asp ó Ser
- 30 <220>
- <221> Característica variada
- 35 <222> (4) .. (4)
- <223> Xaa = aminoácido arbitrario
- 40 <220>
- <221> Característica variada
- 45 <222> (5) .. (5)
- <223> Xaa =aminoácido arbitrario
- <220>
- 50 <221> Característica variada
- <222> (7) .. (7)
- 55 <223> Xaa = aminoácido distinto de Cys
- <220>

<221> Característica variada

<222> (6) .. (6)

5 <223> Xaa = Ser ó Thr

<220>

10 <221> Característica variada

<222> (8) .. (8)

15 <223> Xaa = Gly ó Ala

<400> 23

**Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val**  
**1 5**

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción por fermentación de L-metionina, que abarca las siguientes etapas:

- a) fermentación de un cultivo de bacterias corineformes que producen L-metionina, expresándose en las bacterias corineformes por lo menos una secuencia de nucleótidos, que codifica una proteína con una actividad disminuida de S-adenosil-metionina sintasa (metK) en comparación con la enzima de tipo silvestre, siendo la secuencia codificadora de metK una secuencia de nucleótidos, que codifica una proteína con una actividad disminuida de metK, en la que se ha sustituido por lo menos un resto de cisteína de la proteína de tipo silvestre,
- b) enriquecimiento del producto químico fino que contiene azufre en el medio y/o en las células de bacterias, y
- c) aislamiento del producto químico fino que contiene azufre,

realizándose que la secuencia codificadora de metK es una secuencia codificadora de nucleótidos, que codifica una proteína con actividad de metK, que tiene la siguiente secuencia parcial de aminoácidos:

**G (F/Y) (D/S) X<sup>1</sup>X<sup>2</sup> (S/T) X<sup>3</sup> (G/A) V**

en la que

X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan independientemente entre sí un aminoácido arbitrario;

y

X<sup>3</sup> representa un aminoácido distinto de Cys introducido por mutación.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, realizándose que la secuencia codificadora de metK codifica una proteína con actividad de metK, abarcando la proteína una secuencia de aminoácidos de desde Met1 hasta Ala407 de acuerdo con la SEQ ID NO: 22.

3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, realizándose que la secuencia codificadora de metK es un ADN o un ARN replicable en bacterias corineformes o integrado de una manera estable en el cromosoma.

4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, realizándose que

- a) se emplea una cepa de bacterias transformada con un vector plasmídico, que lleva por lo menos una copia de la secuencia de metK mutada bajo el control de secuencias reguladoras, o
- b) se emplea una cepa, en la que la secuencia de metK mutada se había integrado en el cromosoma de la bacteria.

5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, realizándose que se fermentan unas bacterias corineformes, en las que se ha sobreexpresado al mismo tiempo por lo menos uno de los genes, que se escoge entre

- a) el gen lysC, que codifica una aspartato cinasa,
- b) el gen asd, que codifica una asparato-semialdehído deshidrogenasa,
- c) el gen gap, que codifica la glicerolaldehído-3-fosfato deshidrogenasa,
- d) el gen pgk, que codifica la 3-fosfoglicerato cinasa,
- e) el gen pyc, que codifica la piruvato carboxilasa,
- f) el gen tpi, que codifica la triosafofosfato isomerasa,
- g) el gen metA, que codifica la homoserina O-acetiltransferasa,
- h) el gen metB, que codifica la cistationina-gamma sintasa,
- i) el gen metC, que codifica la cistationina-gamma liasa,
- j) el gen metH, que codifica la metionina sintasa,
- k) el gen glyA, que codifica la serina hidroximetiltransferasa,
- l) el gen metY, que codifica la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa,
- m) el gen metF, que codifica la metilentetrahidrofolato reductasa,
- n) el gen serC, que codifica la fosfoferina aminotransferasa,
- o) el gen serB, que codifica la fosfoferina fosfatasa,

- p) el gen *cysE*, que codifica la serina acetil-transferasa,
  - q) el gen *cysK*, que codifica la cisteína sintasa,
  - r) el gen *hom*, que codifica la homoserina deshidrogenasa;
- y/o

5 en las que se ha mutado al mismo tiempo por lo menos uno de estos genes, de tal manera que la correspondiente proteína, comparada con la proteína no mutada, sea influida en su actividad en una más pequeña medida o ya no sea influida por un metabolito del metabolismo, o que sea aumentada su actividad específica.

10 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, realizándose que se fermentan unas bacterias corineformes, en las que se ha debilitado al mismo tiempo por lo menos uno de los genes, que se escoge entre

- a) el gen *thrB*, que codifica la homoserina cinasa,
  - 15 b) el gen *ilvA*, que codifica la treonina deshidratasa,
  - c) el gen *thrC*, que codifica la treonina sintasa,
  - d) el gen *ddh*, que codifica la meso-diaminopimelato D deshidrogenasa,
  - e) el gen *pck*, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxicinasa,
  - f) el gen *pgi*, que codifica la glucosa-6-fosfato 6-isomerasa,
  - 20 g) el gen *poxB*, que codifica la piruvato oxidasa,
  - h) el gen *dapA*, que codifica la dihidropicolinato sintasa,
  - i) el gen *dapB*, que codifica la dihidropicolinato reductasa; o
  - j) el gen *lysA*, que codifica la diaminopicolinato descarboxilasa;
- y/o

25 realizándose que se fermentan unas bacterias corineformes, en las que se ha mutado al mismo tiempo por lo menos uno de estos genes de tal manera que la actividad enzimática de la correspondiente proteína sea disminuida parcial o completamente.

30 7. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones anteriores, realizándose que se emplean microorganismos de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

35 8. Procedimiento para la producción de un aditivo en piensos para animales que contiene L-metionina a partir de caldos de fermentación, que abarca las siguientes etapas

- a) 40 cultivación y fermentación de un microorganismo, que produce L-metionina, de acuerdo con la definición dada en una de las reivindicaciones anteriores, en un medio de fermentación;
- b) eliminación de agua a partir del caldo de fermentación que contiene L-metionina;
- c) 45 eliminación de la biomasa formada durante la fermentación en una proporción de 0 a 100 % en peso; y
- d) desecación del caldo de fermentación obtenido de acuerdo con b) y/o c), con el fin de obtener el aditivo en piensos para animales en la deseada forma de un polvo o granulado.

Fig. 1

