

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 747**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2001 E 09160843 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 2085482**

64 Título: **Secuencias de nucleótidos que codifican el gen metY**

30 Prioridad:

02.09.2000 DE 10043334

28.02.2001 DE 10109690

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.02.2013

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
RELLINGHAUSER STRASSE 1-11
45128 ESSEN, DE**

72 Inventor/es:

**HÄDRICH, BETTINA;
PFEFFERLE, WALTER;
HUTHMACHER, KLAUS;
RÜCKERT, CHRISTIAN;
KALINOWSKI, JÖRN;
PÜHLER, ALFRED;
BINDER, MICHAEL;
GREISSINGER, DIETER y
THIERBACH, GEORG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 395 747 T3

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

DESCRIPCIÓN

Secuencias de nucleótidos que codifican el gen metY

Campo del invento

- 5 La descripción proporciona unas secuencias de nucleótidos procedentes de bacterias corineformes, que codifican el gen metY. El invento proporciona un procedimiento para la preparación por fermentación de L-metionina, usando bacterias corineformes en las que se ha intensificado por lo menos el gen metY.

Técnica anterior

Ciertos L-aminoácidos, en particular la L-lisina y la L-metionina, se usan en la medicina humana y en la industria de los productos farmacéuticos, en la industria de los alimentos y muy particularmente en la nutrición de animales.

- 10 Es conocido que se preparan aminoácidos por fermentación a partir de cepas de bacterias corineformes, en particular *Corynebacterium glutamicum*. A causa de su gran importancia, se están emprendiendo constantemente trabajos para mejorar los procedimientos de preparación. Los mejoramientos en el procedimiento pueden relacionarse con medidas técnicas de fermentación, tales como, por ejemplo, agitación y suministro de oxígeno, o con la composición de los medios nutrientes, tales como, por ejemplo, la concentración de azúcares durante la fermentación, o con la elaboración para dar la forma del producto mediante, por ejemplo, una cromatografía con intercambio de iones, o con las propiedades de rendimiento intrínseco del microorganismo propiamente dicho.
- 15

Se usan unos métodos de mutagénesis, selección y selección de mutantes para mejorar las propiedades de rendimiento de estos microorganismos. Se obtienen de esta manera unas cepas que son resistentes a antimetabolitos o son auxótrofas para unos metabolitos que tienen importancia reguladora y producen aminoácidos.

- 20 Se han empleado también durante algunos años unos métodos de la técnica de ADN recombinante para mejorar las cepas de unas cepas de *Corynebacterium* que producen L-aminoácidos, por amplificación de genes individuales para la biosíntesis de aminoácidos e investigar el efecto sobre la producción de aminoácidos.

Yamagata, en *Biochimie*, volumen 71, 1989, 1125-1143 describen el gen de MetY, y su importancia primordial en la ruta de la síntesis de metionina en el seno p.ej. de *C. glutamicum*.

- 25 El documento de solicitud de patente internacional WO93/17112A describe el procedimiento para la producción por fermentación de L-metionina, estando basado este método en la transformación de una *Corynebacterium glutamicum* con un vector de expresión que comprende genes implicados en la ruta de biosíntesis de la L-metionina, tal como el gen metE, así como la secuencia que codifica el gen metA o la secuencia que codifica la O-acetil-homoserina (tiol)-liasa que puede ser transfectada concomitantemente junto con la secuencia que codifica el gen metE.
- 30

Objetivo del invento

Los autores del invento tenían el objetivo de proporcionar nuevas medidas técnicas para la preparación por fermentación mejorada de L-metionina.

Sumario del invento

- 35 Cuando se mencionan en lo sucesivo L-aminoácidos o aminoácidos, este concepto significa uno o más aminoácidos, inclusive sus sales, que se escogen entre el conjunto que consiste en L-asparagina, L-treonina, L-serina, L-glutamato, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano y L-arginina.

- 40 Cuando se mencionan en lo sucesivo L-lisina o lisina, se entienden por este concepto no solamente las bases sino también las sales, tales como p.ej. el monohidrocloreto de lisina o el sulfato de lisina.

Cuando se mencionan en lo sucesivo L-metionina o metionina, se entienden también por este concepto las sales, tales como p.ej. el hidrocloreto de metionina o el sulfato de metionina.

La descripción proporciona un polinucleótido aislado proceden mejorada te de bacterias corineformes, que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica el gen metY, escogido entre el conjunto que consiste en

- a) un polinucleótido que es idéntico en el grado de por lo menos un 70 % a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2,
- b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en el grado de por lo menos un 70 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2,
- 5 c) un polinucleótido que es complementario con los polinucleótidos de a) o b) y
- d) un polinucleótido que comprende por lo menos 15 nucleótidos sucesivos de la secuencia de polinucleótido de a), b) o c),

teniendo el polipéptido preferiblemente la actividad de la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa.

10 La descripción proporciona también el polinucleótido antes mencionado, siendo éste preferiblemente un ADN que es capaz de replicación, que comprende:

- (i) la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID No. 1, o
- (ii) por lo menos una secuencia que corresponde a la secuencia (i) dentro del alcance de la degeneración del código genético, o
- 15 (iii) por lo menos una secuencia que se hibrida con la secuencia complementaria con la secuencia (i) o (ii), y opcionalmente
- (iv) unas mutaciones de sentido con función neutra en (i).

La descripción proporciona también

un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID No. 1;

20 un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID No. 2;

un vector que contiene la secuencia de ADN de *C. glutamicum* que codifica el gen metY, depositado de acuerdo con el Tratado de Budapest en *Corynebacterium glutamicum* como pCREmetY el 21.06.2000 bajo la referencia DSM 13556

25 y bacterias corineformes en las que el gen metY está presente en una forma intensificada, en particular por el vector pCREmetY.

30 La descripción proporciona también unos polinucleótidos que comprenden sustancialmente una secuencia de polinucleótido, los cuales son obtenibles por escrutinio mediante una hibridación de una correspondiente biblioteca de genes (genoteca) de una bacteria corineforme, que comprende el gen completo o partes del mismo, con una sonda que comprende la secuencia del polinucleótido de acuerdo con el invento, de acuerdo con la SEQ ID No. 1; o un fragmento de la misma y el aislamiento de la secuencia de polinucleótido mencionada.

35 Descripción detallada del invento

Los polinucleótidos que comprenden las secuencias de acuerdo con la descripción son apropiados como sondas de hibridación para ARN, ADNc y ADN, con el fin de aislar, en su plena longitud, ácidos nucleicos o polinucleótidos o genes que codifican la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa o de aislar los ácidos nucleicos o polinucleótidos o genes que tienen una alta similaridad de secuencia con la de la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa.

40 Los polinucleótidos que comprenden las secuencias de acuerdo con la descripción son además apropiados como unos cebadores, con ayuda de los cuales se pueden preparar los ADN de genes que codifican la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, acrónimo de polymerase chain reaction).

45 Dichos oligonucleótidos que sirven como sondas o cebadores comprenden por lo menos 30, de manera preferible por lo menos 20, de manera muy particularmente preferible por lo menos 15 nucleótidos sucesivos. Son apropiados también unos oligonucleótidos que tienen una longitud de por lo menos 40 o 50 nucleótidos. Opcionalmente son también apropiados unos oligonucleótidos con una longitud de por lo menos 100, 150, 200, 250 o 300 nucleótidos.

El concepto de "aislado" significa separado con respecto de su entorno natural.

El concepto de "polinucleótido" se refiere en general a polirribonucleótidos y polidesoxirribonucleótidos, siendo posible que éstos sean unos ARN o ADN no modificados o unos ARN o ADN modificados.

5 Los polinucleótidos de acuerdo con la descripción incluyen un polinucleótido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o un fragmento preparado a partir del mismo y también los que son idénticos en por lo menos un 70 %, de manera preferible en por lo menos un 80 % y en particular por lo menos en un 90 % hasta un 95 % al polinucleótido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o a un fragmento preparado a partir del mismo.

Se entiende que el concepto de "polipéptidos" significa los péptidos o las proteínas que comprenden dos o más aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos.

10 Los polipéptidos de acuerdo con la descripción incluyen un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2, en particular los que tienen la actividad biológica de la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa, y también los que son idénticos por lo menos en un 70 %, preferiblemente por lo menos un 80 %, y en particular por lo menos en un 90 % hasta un 95 % al polipéptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2 y tienen la actividad mencionada.

15 El invento proporciona también un procedimiento para la preparación por fermentación de L-metionina, que comprende llevar a cabo las siguientes etapas:

a) fermentación de bacterias corineformes que producen dicha L-metionina, y en donde es intensificada recombinantemente por lo menos la expresión del gen metY que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es idéntico en por lo menos un 90 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 y tiene la actividad de la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa, por aumento del número de copias del gen o por uso de un potente promotor en un medio,

20

b) concentración de dicha L-metionina en el medio o en las células de la bacteria; y

c) aislamiento de dicha L-metionina.

25 El término "intensificación" en conexión con este texto describe el aumento en la actividad intracelular de una o más enzimas presentes en un microorganismo, que es o son codificada(s) por el correspondiente ADN, por ejemplo por aumento del número de copias del gen o de los genes, por uso de un potente promotor o por uso de un gen que codifica una correspondiente enzima que tiene una alta actividad, y opcionalmente por combinación de estas medidas técnicas.

30 Por medidas técnicas de intensificación, en particular de sobreexpresión, la actividad o concentración de la correspondiente proteína es por lo general aumentada en por lo menos un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, hasta un máximo de un 1.000 % o 2.000 %, basada en el microorganismo de partida.

35 Los microorganismos que se usan en el presente invento pueden preparar L-metionina a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, un almidón, una celulosa o a partir de glicerol y etanol. Ellos pueden ser representantes de bacterias corineformes, en particular del género *Corynebacterium*. Del género *Corynebacterium* se puede mencionar en particular la especie *Corynebacterium glutamicum*, que es conocida entre los expertos por su capacidad de producir L-aminoácidos.

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

40 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 y
45 *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

o unos mutantes que producen L-metionina, o unas cepas preparadas a partir de ellos, tales como, por ejemplo

50 *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

El nuevo gen metY procedente de *C. glutamicum*, que codifica la enzima O-acetil-homoserina sulfhidrilasa (EC 4.2.99.10), ha sido aislado.

5 Para aislar el gen metY o también otros genes de *C. glutamicum*, se establece primeramente una genoteca de este microorganismo en *Escherichia coli* (*E. coli*). El establecimiento de genotecas se describe en libros de texto y manuales generalmente conocidos. El libro de texto de Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* [Genes y clones, una introducción en la tecnología genética], (editorial 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) se puede mencionar como un ejemplo. Una genoteca bien conocida es la de la cepa W3110 de *E. coli* K-12 establecida en vectores λ por Kohara y colaboradores (*Cell* 50, 495 - 508 (1987)). Bathe y colaboradores (*Molecular and General Genetics*, 252: 255-265, 1996) describen una genoteca de *C. glutamicum* ATCC13032, que fue establecida con la ayuda del vector cósmido 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) en la cepa NM554 de *E. coli* K-12 (Raleigh y colaboradores, 1988, *Nucleic Acids Research* 16:1563-1575).

15 Börmann y colaboradores (*Molecular Microbiology* 6(3), 317-326) (1992) a su vez, describen una genoteca de *C. glutamicum* ATCC13032 que usa el cósmido pHC79 (Hohn and Collins, *Gene* 11, 291-298 (1980)). Para preparar una genoteca de *C. glutamicum* en *E. coli* es también posible usar unos plásmidos tales como el pBR322 (Bolívar, *Life Sciences*, 25, 807-818 (1979)) o el pUC9 (Vieira y colaboradores, 1982, *Gene*, 19:259-268). Unas apropiadas anfitrionas son en particular, las cepas de *E. coli* defectuosas en cuanto a restricción y recombinación. Un ejemplo de éstas es la cepa DH5 α mc r , que ha sido descrita por Grant y colaboradores (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87 (1990) 4645-4649). Los fragmentos largos de ADN, clonados con la ayuda de cósmidos, pueden a su vez ser subclonados en los usuales vectores apropiados para secuenciación y luego pueden ser secuenciados, tal como ha sido descrito p.ej. por Sanger y colaboradores (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467, 1977).

25 Las resultantes secuencias de ADN pueden luego ser investigadas con conocidos algoritmos o programas para el análisis de secuencias, tales como p.ej. el de Staden (*Nucleic Acids Research* 14, 217-232 (1986)), el de Marck (*Nucleic Acids Research* 16, 1829-1836 (1988)) o el programa GCG de Butler (*Methods of Biochemical Analysis* [Métodos de análisis bioquímicos] 39, 74-97 (1998)).

30 La descrita secuencia de ADN de *C. glutamicum* que codifica el gen metY y que, como SEQ ID No. 1, es una constituyente de la presente descripción, ha sido encontrada. La secuencia de aminoácidos de la correspondiente proteína ha sido derivada además a partir de la presente secuencia de ADN por los métodos más arriba descritos. La resultante secuencia de aminoácidos del producto del gen metY se muestra en la SEQ ID No. 2.

35 Las secuencias de ADN de codificación, que resultan de la SEQ ID No. 1 por la degeneración del código genético, son también un constituyente de la descripción. De la misma manera, las secuencias de ADN que se hibridan con la SEQ ID No. 1 o con partes de la SEQ ID No. 1, son un constituyente de la descripción. Unos intercambios conservativos de aminoácidos, tales como p.ej. un intercambio de glicina por alanina o de ácido aspártico por ácido glutámico en proteínas, son conocidos además entre los expertos como "mutaciones de sentido" que no conducen a un cambio fundamental en la actividad de la proteína, es decir que son de función neutra. Es conocido además que, 40 unos cambios en los extremos terminales de N y/o C de una proteína no pueden perjudicar sustancialmente o incluso pueden estabilizar la función de la misma. Una información en este contexto puede ser encontrada por un experto, entre otras citas, en la de Ben-Bassat y colaboradores (*Journal of Bacteriology* 169:751-757 (1987)), en la de O'Regan y colaboradores (*Gene* 77:237-251 (1989)), en la de Sahin-Toth y colaboradores (*Protein Sciences* 3:240-247 (1994)), en la de Hochuli y colaboradores (*Bio/Technology* 6:1321-1325 (1988)) y en conocidos libros de texto de biología genética y molecular. Las secuencias de aminoácidos que resultan de una manera correspondiente 45 a partir de la SEQ ID No. 2 son también una parte constituyente de la descripción.

De la misma manera, unas secuencias de ADN que se hibridan con la SEQ ID No. 1 o con partes de la SEQ ID No. 1 son un constituyente de la descripción. Finalmente, unas secuencias de ADN que se preparan por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando unos cebadores que resultan de la SEQ ID No. 1, son un constituyente de la descripción. Dichos oligonucleótidos tienen típicamente una longitud de por lo menos 15 nucleótidos.

50 Unas instrucciones para identificar secuencias de ADN por medio de una hibridación pueden ser encontradas por un experto, entre otras citas, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" [La guía de usuarios del sistema DIG para una hibridación con filtros] de Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en la de Liebl y colaboradores (*International Journal of Systematic Bacteriology* (1991), 41: 255-260). La hibridación tiene lugar en condiciones rigurosas, es decir que solamente se forman unos híbridos en los que la sonda y la 55 secuencia diana, es decir los polinucleótidos tratados con la sonda, son idénticas por lo menos en un 70 %. Es conocido que la rigurosidad de la hibridación, incluyendo las etapas de lavado, es influida o determinada haciendo variar la composición del tampón, la temperatura y la concentración de la sal. La reacción de hibridación se lleva a

cabo preferiblemente en una rigurosidad relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide [Guía de hibridación Hybaid], Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996).

5 Un tampón 5x SSC a una temperatura de aproximadamente. 50 - 68°C, por ejemplo, se puede emplear para la reacción de hibridación. Se pueden hibridar también aquí unas sondas con unos polinucleótidos que son idénticos en menos de un 70 % a la secuencia de la sonda. Dichos híbridos son menos estables y son eliminados por lavado en condiciones rigurosas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, haciendo disminuir la concentración de la sal a 2x SSC y opcionalmente de manera subsiguiente a 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995) siendo establecida una temperatura de aproximadamente 50 - 68°C. Opcionalmente es posible disminuir la concentración de la sal hasta 0,1x SSC. Unos fragmentos de polinucleótidos, que por ejemplo son idénticos por lo menos en un 70 % o por lo menos en un 80 % o por lo menos en un 90 % hasta un 95 % a la secuencia de la sonda empleada, se pueden aislar aumentando la temperatura de hibridación escalonadamente desde 50 hasta 68°C en escalones de aproximadamente 1 - 2°C. Unas instrucciones adicionales acerca de la hibridación son obtenibles en el mercado en la forma de unos denominados estuches (p.ej. el DIG Easy Hyb de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 1603558).

15 Unas instrucciones para la amplificación de secuencias de ADN con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden encontrar por un experto, entre otras citas bibliográficas, en el manual de Gait: Oligonucleotide synthesis: A Practical Approach [Síntesis de oligonucleótidos: un enfoque práctico] (IRL Press, Oxford, Reino Unido, 1984) y en la de Newton y Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994).

20 Se ha encontrado que ciertas bacterias corineformes producen L-metionina de una manera mejorada después de una sobreexpresión del gen metY, opcionalmente en combinación con el gen metA.

25 Para conseguir una sobreexpresión, se puede aumentar el número de copias de los correspondientes genes, o se puede mutar la región de promotor y de regulación o el sitio de fijación a ribosomas situado corriente arriba del gen estructural. Unas casetes de expresión que son incorporadas corriente arriba del gen estructural actúan de la misma manera. Por medio de promotores inducibles es posible adicionalmente aumentar la expresión en el curso de la producción de L-metionina por fermentación. La expresión es similarmente mejorada mediante unas medidas técnicas para prolongar la vida del ARN m (mensajero). Además, la actividad enzimática es aumentada también por evitación de la degradación de la proteína de enzima. Los genes o las construcciones artificiales de genes o bien pueden estar presentes en unos plásmidos con un número variables de copias, o se pueden integrar y amplificar en el cromosoma. Alternativamente, una sobreexpresión de los genes en cuestión se puede conseguir además cambiando la composición de los medios y el procedimiento de cultivación.

35 Unas instrucciones en este contexto pueden ser encontradas por un experto, entre otras citas, en la de Martin y colaboradores (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), en la de Guerrero y colaboradores (Gene 138, 35-41 (1994)), en la de Tsuchiya y Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), en la de Eikmanns y colaboradores (Gene 102, 93-98 (1991)), en la memoria de patente europea 0 472 869, en la patente de los EE.UU. US 4.601.893, en la de Schwarzer y Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), en la de Reinscheid y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), en la de LaBarre y colaboradores (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), en la solicitud de patente internacional WO 96/15246, en la de Malumbres y colaboradores (Gene 134, 15 - 24 (1993)), en la memoria descriptiva de solicitud de patente japonesa abierta a la inspección pública JP-A-10-229891, en la de Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), en la de Makrides (Microbiological Reviews 60: 512-538 (1996)) y en conocidos libros de texto de biología genética y molecular.

45 A modo de ejemplo, para realizar la intensificación el gen metY de acuerdo con el invento fue sobreexpresado con ayuda de plásmidos episomales. Unos plásmidos apropiados son los que son replicados en bacterias corineformes. Numerosos vectores plásmidos 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)) están basados en los plásmidos crípticos pHM1519, pBL1 o pGA1. Se pueden usar de la misma manera otros vectores plásmidos, tales como p.ej. los basados en el pCG4 (documento 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).

Ejemplos de dichos vectores plásmidos se muestran en las Figuras 1 y 2.

55 Unos vectores plásmidos, que son apropiados además, son también aquellos con cuya ayuda se puede usar el proceso de amplificación de un gen por integración en el cromosoma, como ha sido descrito, por ejemplo, por Reinscheid y colaboradores, (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) para una duplicación o amplificación del operón hom-thrB. En este método, el gen completo es clonado en un vector plásmido que se puede replicar en una anfitrión (típicamente E. coli), pero no en C. glutamicum. Unos posibles vectores son, por ejemplo, el pSUP301 (Simon y colaboradores, Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), el pK18mob o pK19mob (Schäfer y

colaboradores, Gene 145, 69-73 (1994)), el pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.), el pCR2.1-TOPO (Shuman (1994) Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; documento US-A 5,487,993), el pCR®Blunt (Invitrogen, Groningen, Holanda; Bernard y colaboradores, Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), el pEM1 (Schumpf y colaboradores 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) o el pBGS8 (Spratt y colaboradores, 1986, Gene 41: 337-342). El vector plásmido que contiene el gen que ha de ser amplificado es luego transferido a la deseada cepa de *C. glutamicum* por conjugación o transformación. El método de conjugación ha sido descrito, por ejemplo, por Schäfer y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)). Unos métodos para efectuar la transformación han sido descritos, por ejemplo por Thierbach y colaboradores (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican y Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) y Tauch y colaboradores (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)). Después de una recombinación homóloga, por ejemplo por medio de un suceso de "cross over" [cruzamiento], la resultante cepa contiene por lo menos dos copias del gen en cuestión.

Además, puede ser ventajoso para la producción de L-metionina, intensificar una o más enzimas de la ruta de biosíntesis particular, de glicólisis, de anaplerosis, o de exportación de aminoácidos, además del gen metY.

Así, por ejemplo, para la preparación de L-metionina se puede(n) intensificar, en particular sobreexpresar, uno o más genes tomados del conjunto que consiste en

- el gen gap que codifica la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- el gen tpi que codifica la triosa fosfato isomerasa (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 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 (documento de solicitud de patente alemana DE-A-198 31 609),
- el gen lysC que codifica una aspartato cinasa resistente a la retroalimentación (Número de ACCESO P26512),
- el gen metA que codifica la homoserina O-acetil-transferasa (Número de ACCESO AF052652),
- el gen metB que codifica la cistationina gamma-sintasa (Número de ACCESO AF126953),
- el gen aecD que codifica la cistationina-gamma-liasa (Número de ACCESO M89931)
- el gen glyA que codifica la serina hidroximetil-transferasa (documento de solicitud de patente japonesa JP-A-08107788),

prefiriéndose particularmente una intensificación adicional de metA.

Puede ser además ventajoso para la producción de L-metionina, por añadidura a la intensificación del gen metY, que sean atenuados uno o más genes escogidos entre el conjunto que consiste en

- el gen pck que codifica la fosfoenol piruvato carboxicinas (documento DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- el gen pgi que codifica la glucosa 6-fosfato isomerasa (documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 09/396,478, DSM 12969),
- el gen poxB que codifica la piruvato oxidasa (documento DE: 1995 1975.7; DSM 13114)
- el gen thrB que codifica la homoserina cinasa (Número de ACCESO P08210),
- el gen ilvA que codifica la treonina deshidratasa (Número de ACCESO Q04513),
- el gen thrC que codifica la treonina sintasa (Número de ACCESO P23669),
- el gen ddh que codifica la meso-diaminopimelato D-deshidrogenasa (Número de ACCESO Y00151),

en particular que sea reducida la expresión de los mismos.

- 5 El término "intensificación" en conexión con este texto describe el aumento en la actividad intracelular de una o más enzimas (proteínas) en un microorganismo, que son codificadas por el correspondiente ADN, por ejemplo por aumento del número de copias del gen o de los genes, por uso de un potente promotor o por uso de un gen o alelo que codifica una correspondiente enzima (proteína) que tiene una alta actividad, y opcionalmente por combinación de estas medidas técnicas.
- Por medidas técnicas de intensificación, en particular de sobreexpresión, la actividad o la concentración de la correspondiente proteína es por lo general aumentada en por lo menos un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, hasta un máximo de 1.000 % a 2.000 %, basado en el microorganismo de partida.
- 10 Además de una sobreexpresión del gen metY, opcionalmente en combinación con el gen meta, puede ser ventajoso además, para la producción de L-metionina, eliminar reacciones secundarias indeseables, (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms" [Crianza de microorganismos que producen aminoácidos], en: Overproduction of Microbial Products [Sobreproducción de productos microbianos], Krumphanzl, Sikyta, Vanek (coordinadores de edición), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).
- 15 Los microorganismos preparados de acuerdo con el invento se pueden cultivar de una manera continua o discontinua en el proceso batch (cultivo discontinuo), o en el proceso fed batch (proceso de alimentación) o en el proceso repeated fed batch (proceso de alimentación repetida) para la finalidad de la producción de L-metionina. Un sumario de métodos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Técnica de bioprocesos 1. Introducción en la técnica de 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)).
- 20 El medio de cultivo que se ha de usar debe de cumplir los requisitos de las cepas particulares de una manera apropiada. Unas descripciones de medios de cultivo para diversos microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" [Manual de métodos para la bacteriología general] de la American Society for Bacteriology [Sociedad Americana de Bacteriología] (Washington D.C., EE.UU., 1981).
- 25 Unos azúcares e hidratos de carbono, tales como p.ej. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, un almidón y una celulosa, aceites y grasas, tales como p.ej. aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos, tales como p.ej. ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como p.ej. glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como p.ej. ácido acético, se pueden usar como la fuente de carbono. Estas sustancias se pueden usar individualmente o como una mezcla de ellas.
- 30 Unos compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, un extracto de levadura, un extracto de carne, un extracto de malta, un líquido de maceración de maíz, una harina de soja y urea, o unos compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio, se pueden usar como la fuente de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno se pueden usar individualmente o como una mezcla de ellas.
- 35 Un ácido fosfórico, el dihidrógeno fosfato de potasio, el hidrógeno fosfato de dipotasio o las correspondientes sales que contienen sodio, se pueden usar como la fuente de fósforo.
- Unos compuestos orgánicos e inorgánicos que contienen azufre, tales como, por ejemplo, sulfuros, sulfitos, sulfatos y tiosulfatos, se pueden usar como una fuente de azufre, en particular para la preparación de aminoácidos que contienen azufre.
- 40 El medio de cultivo debe de comprender además unas sales de metales, tales como p.ej. sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, unas sustancias de crecimiento esenciales, tales como aminoácidos y vitaminas, se pueden emplear por añadidura a las sustancias antes mencionadas. Por lo demás se pueden añadir al medio de cultivo unos apropiados compuestos precursores. Las sustancias de partida mencionadas pueden ser añadidas al cultivo en la forma de una única tanda, o se pueden alimentar durante el cultivo de una manera apropiada.
- 45 Unos compuestos de carácter básico, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o amoníaco acuoso, o unos compuestos de carácter ácido, tales como un ácido fosfórico o ácido sulfúrico, se pueden emplear de una manera apropiada para controlar el valor del pH. Unos agentes antiespumantes tales como p.ej. ésteres de poliglicoles con ácidos grasos, se pueden emplear para controlar y reprimir el desarrollo de espuma. Unas sustancias apropiadas que tienen una acción selectiva, tales como p.ej. antibióticos, se pueden añadir al medio con el fin de mantener la estabilidad de los plásmidos. Para mantener condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o unas mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como p.ej. aire. La temperatura del cultivo es usualmente de 20°C a 45°C, y preferiblemente de 25°C a 40°C. La cultivación se continúa hasta que se haya
- 50

formado una cantidad máxima del producto deseado. Este objetivo se alcanza usualmente en el transcurso de 10 horas a 160 horas.

5 Los caldos de fermentación obtenidos de esta manera tienen usualmente un peso en seco de 7,5 a 25 % en peso y contienen L-metionina. Además, es también ventajoso que la fermentación sea realizada en un proceso con presencia limitada de azúcares por lo menos al final, pero en particular a lo largo de por lo menos un 30 % de la duración de la fermentación. Esto quiere decir que la concentración del azúcar utilizable en el medio de fermentación es reducida a ≥ 0 hasta 3 g/l durante este período de tiempo.

10 El caldo de fermentación preparado de esta manera, que contiene L-metionina, es luego elaborado ulteriormente. Dependiendo de los requisitos, la totalidad o alguna cantidad de la biomasa, se puede retirar desde el caldo de fermentación por métodos de separación, tales como p.ej. los de centrifugación, filtración, decantación o una combinación de los mismos, o se puede dejar por completo en éste. Este caldo es luego espesado o concentrado por métodos conocidos, tal como p.ej., con la ayuda de un evaporador rotatorio, un evaporador de película delgada, un evaporador de película descendente, por ósmosis inversa, o por nanofiltración. Este caldo de fermentación concentrado puede ser luego elaborado por métodos de liofilización, desecación por atomización, granulación por atomización, o por otros procesos, para dar un polvo finamente dividido, de manera preferible libremente fluyente.

15 Este polvo finamente dividido y libremente fluyente puede ser a su vez convertido por apropiados procesos de compactación o granulación en un producto de grano grueso, libremente fluyente con facilidad, almacenable y ampliamente exento de polvo fino. En la granulación o compactación es ventajoso emplear unas convencionales sustancias auxiliares o unos vehículos orgánicas/os o inorgánicas/os convencionales, tales como un almidón, una gelatina, derivados de celulosas o sustancias similares, tal como se usan convencionalmente como agentes aglutinantes, agentes gelificantes o espesantes en piensos o alimentos en general o en la elaboración de productos alimenticios, u otras sustancias adicionales, tales como, por ejemplo, sílice, silicatos o estearatos.

20 Se entiende que el término "libremente fluyente" significa unos polvos que fluyen sin impedimento fuera del recipiente con la abertura de 5 mm (milímetros) de una serie de recipientes de salida de vidrio que tienen orificios de salida de diversos tamaños (Klein, Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).

25 Tal como se describe aquí, el término "finamente dividido" significa un polvo que tiene un contenido predominante (> 50 %) con un tamaño de partículas que tienen unos diámetros de 20 a 200 μm . El término "de granos gruesos" significa unos productos que tienen un contenido predominante (> 50 %) con un tamaño de partículas que tienen unos diámetros de 200 a 2.000 μm . En este contexto, el término "libre de polvo fino" significa que el producto tiene solamente un pequeño contenido (< 5 %) con unos tamaños de partículas que tienen un diámetro de menos que 20 μm . La determinación de los tamaños de partículas se puede llevar a cabo con métodos de espectrometría por difracción con rayos láser. Los correspondientes métodos se describen en el libro de texto de "Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis" [Medición de los tamaños de partículas en la práctica de laboratorio] por R. H. Müller y R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) y en el libro de texto "Introduction to Particle Technology" [Introducción en la tecnología de las partículas] por M. Rhodes, editorial Wiley & Sons (1998).

El término "almacenable" en el contexto de este invento, significa un producto que se puede almacenar hasta durante 120 días, de manera preferiblemente hasta durante 52 semanas, de manera particularmente preferible durante 60 meses, sin que aparezca una pérdida sustancial (< 5 %) de metionina.

40 Alternativamente, sin embargo, el producto puede ser absorbido sobre una sustancia de vehículo orgánica o inorgánica que es conocida y convencional en el tratamiento de alimentos y piensos, tales como, por ejemplo, sílice, silicatos, gravillas, salvados, harinas, almidones, azúcares u otros materiales, y/o puede ser mezclado y estabilizado con agentes espesantes o aglutinantes convencionales. Unos ejemplos de uso y unos procedimientos en este contexto se describen en la bibliografía (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, página 817).

45 Finalmente, el producto puede ser llevado a un estado en el que él es estable para una digestión por estómagos de animales, en particular por el estómago de rumiantes, mediante procesos de revestimiento (en inglés "coating") usando agentes formadores de películas, tales como, por ejemplo, carbonatos metálicos, sílices, silicatos, alginatos, estearatos, almidones, gomas y éteres de celulosas, tal como se describen en el documento de patente alemana DE-C-4100920.

50 Si la biomasa es separada durante el proceso, otros materiales sólidos inorgánicos, añadidos por ejemplo durante la fermentación, son por lo general eliminados. Además, el aditivo para piensos de animales de acuerdo con el invento comprende por lo menos la proporción predominante de las otras sustancias adicionales, en particular sustancias orgánicas, que se forman o añaden y están presentes en forma de soluciones en el caldo de fermentación, cuando éstas no han sido separadas por medio de procesos apropiados.

5 En un aspecto del invento, la biomasa puede ser separada en un grado hasta de 70 %, de manera preferible hasta de 80 %, de manera más preferible hasta de 90 %, de manera aún más preferible hasta de 95 %, y de manera particularmente preferiblemente hasta de 100 %. En otro aspecto del invento, se separa hasta un 20 % de la biomasa, de manera preferible hasta un 15 %, de manera más preferible hasta un 10 %, de manera aún más preferible hasta un 5 %, y de manera particularmente preferible no se separa ninguna biomasa.

10 Estas sustancias orgánicas incluyen unos subproductos orgánicos que son producidos opcionalmente, además de la L-metionina, y son descargados opcionalmente por los microorganismos empleados en la fermentación. Éstos incluyen unos L-aminoácidos escogidos entre el conjunto que consiste en L-lisina, L-valina, L-treonina, L-alanina o L-triptófano. Ellos incluyen unas vitaminas escogidas entre el conjunto que consiste en vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6 (piridoxina), vitamina B12 (cianocobalamina), ácido nicotínico/nicotinamida y vitamina E (tocoferol). Ellos incluyen además unos ácidos orgánicos que llevan de uno a tres grupos carboxilo, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico o ácido fumárico. Finalmente, ellos incluyen también unos azúcares, tales como, por ejemplo, trehalosa. Estos compuestos son opcionalmente deseados si es que ellos mejoran el valor nutritivo del producto.

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

El producto antes descrito es apropiado como un aditivo para productos alimenticios, es decir un aditivo para piensos, para la nutrición de animales.

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

El invento, de manera correspondiente, proporciona también un procedimiento para la preparación de un aditivo para piensos de animales, que contiene L-metionina, a partir de unos caldos de fermentación, que comprende las etapas de

- 35 a) cultivar y fermentar un microorganismo que produce L-metionina en un medio de fermentación;
- b) eliminar agua a partir del caldo de fermentación que contiene L-metionina (concentración)
- c) eliminar una proporción de 0 a 100 % en peso de la biomasa formada durante la fermentación; y
- d) secar el caldo de fermentación obtenido de acuerdo con las etapas a) y/o b) para obtener el aditivo para piensos de animales en la deseada forma de polvos o gránulos.

40 Si se desea, una o más de las siguientes etapas se puede(n) llevar a cabo además en el procedimiento de acuerdo con el invento:

- e) adición de una o más sustancias orgánicas, que incluyen L-metionina y/o D-metionina y/o la mezcla racémica D,L-metionina, a los productos obtenidos de acuerdo con a), b) y/o c);
- 45 f) adición de unas sustancias auxiliares escogidas entre el conjunto que consiste en sílice, silicatos, estearatos, gravillas y salvado a las sustancias obtenidas de acuerdo con a) hasta d) para la estabilización y para el aumento de la almacenabilidad;
- g) conversión de las sustancias de acuerdo con las etapas a) hasta e) en una forma que permanece estable en el estómago de un animal, en particular en el rumen, mediante revestimiento con agentes formadores de películas.

El análisis de L-lisina y L-metionina se puede llevar a cabo mediante una cromatografía con intercambio de iones con una subsiguiente derivatización con ninhidrina, tal como ha sido descrito por Spackman y colaboradores (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190).

5 El siguiente microorganismo fue depositado como un cultivo puro el 21.06.2000 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ acrónimo de Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemania) de acuerdo con el Tratado de Budapest:

- *Corynebacterium glutamicum* cepa DSM5715/pCREmetY como DSM 13556

El procedimiento de acuerdo con el invento se usa para la preparación por fermentación de L-metionina.

El presente invento es explicado con mayor detalle a continuación con la ayuda de Ejemplos de realización.

10 Ejemplo 1

Preparación de una genoteca genómica de cósmidos, procedente de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

15 Un ADN cromosomal procedente de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 fue aislado tal como ha sido descrito por Tauch y colaboradores (1995, Plasmid 33:168-179) y disociado parcialmente con la enzima de restricción Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción de Producto Sau3AI, nº de código 27-0913-02). Los fragmentos de ADN fueron desfosforilados con una fosfatasa alcalina de gamba (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Descripción del Producto SAP (acrónimo de shrimp alkaline phosphatase), nº de código 1758250). El ADN del vector cósmido SuperCos1 (Wahl y colaboradores (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, EE.UU. 84:2160-2164), obtenido a partir de Stratagene (La Jolla, EE.UU, Descripción del Producto estuche SuperCos1 Cosmid Vector Kit, nº de código 251301) fue disociado con la enzima de restricción XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del Producto XbaI, nº de código 27-0948-02) y similarmente desfosforilado con una fosfatasa alcalina de gamba.

25 El ADN de cósmido fue luego disociado con la enzima de restricción BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del Producto BamHI, nº de código 27-0868-04). El ADN del cósmido tratado de esta manera se mezcló con el ADN de ATCC13032 tratado y la tanda se trató con la ligasa de ADN de T4 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del Producto ligasa de ADN de T4, nº de código 27-0870-04). La mezcla de ligación fue empaquetada luego en fagos con la ayuda del extracto de empaquetamiento Gigapack II XL Packing Extract (Stratagene, La Jolla, EE.UU., Descripción del Producto Gigapack II XL Packing Extract, nº de código 200217).

30 Para la infección de la cepa NM554 de *E. coli* (Raleigh y colaboradores 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) las células fueron recogidas en MgSO₄ 10 mM y mezcladas con una parte alícuota de la suspensión de fagos. La infección y la titulación de la biblioteca de cósmidos se llevaron a cabo tal como ha sido descrito por Sambrook y colaboradores (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor), siendo las células extendidas en placas sobre un agar de LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) con 100 mg/l de ampicilina. Después de una noche a 37°C, se seleccionaron unos clones individuales recombinantes.

Ejemplo 2

35 Aislamiento y secuenciación del gen metY

40 El ADN de cósmido de una colonia individual fue aislado con el estuche Quiaprep Spin Miniprep Kit (nº de producto. 27106, Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y fue disociado parcialmente con la enzima de restricción Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del Producto Sau3AI, nº de producto 27-0913-02). Los fragmentos de ADN fueron desfosforilados con una fosfatasa alcalina de gamba (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Descripción del Producto SAP, nº de producto 1758250). Después de una separación mediante electroforesis en gel, los fragmentos de cósmidos en el intervalo de tamaños de 1.500 a 2.000 pb (pares de bases, del inglés bps) fueron aislados con el estuche QiaExII Gel Extraction Kit (nº de producto 20021, Qiagen, Hilden, Alemania).

45 El ADN del vector de secuenciación pZero-1, obtenido a partir de Invitrogen (Groningen, Países Bajos, Descripción del Producto estuche Zero Background Cloning Kit, nº de producto K2500-01) fue disociado con la enzima de restricción BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del Producto BamHI, nº de producto 27-0868-04). La ligación de los fragmentos de cósmidos en el vector de secuenciación pZero-1 se llevó a cabo tal como se ha descrito por Sambrook y colaboradores (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor), siendo incubada la mezcla de ADN durante una noche con la ligasa de T4 (Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania).
50 Esta mezcla de ligación fue luego electroporada (Tauch y colaboradores 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7)

dentro de la cepa DH5mcr de *E. coli* (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU., 87: 4645-4649) y fue extendida en placas sobre un agar de LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) con 50 mg/l de zeocina.

La preparación de plásmidos de los clones recombinantes se llevó a cabo con el Biorobot 9600 (n° de producto 900200, Qiagen, Hilden, Alemania). La secuenciación se llevó a cabo mediante el método de terminación de cadena didesoxi de Sanger y colaboradores (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU., 74:5463-5467) con unas modificaciones de acuerdo con Zimmermann y colaboradores (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Se usó el "estuche de secuenciación RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" procedente de PE Applied Biosystems (n° de producto 403044, Weiterstadt, Alemania). La separación mediante una electroforesis en gel y el análisis de la reacción de secuenciación se llevaron a cabo en un gel "Rotiphoresis NF Acrylamide/Bisacrylamide" Gel (29:1) (n° de producto A124.1, Roth, Karlsruhe, Alemania) con el secuenciador "ABI Prism 377" procedente de PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Alemania).

Los datos obtenidos de secuencias en bruto fueron luego elaborados usando el paquete de programas de Staden (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) versión 97-0. Las secuencias individuales de los derivados de pZero1 fueron ensamblados para dar un contig continuo. El análisis de la región de codificación asistido por ordenador fue preparado con el programa XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231).

La resultante secuencia de nucleótidos es mostrada en SEQ ID No. 1. El análisis de la secuencia de nucleótidos mostró un cuadro de lectura abierto de 1.313 pares de bases, que fue denominado el gen metY. El gen metY codifica una proteína de 437 aminoácidos.

Ejemplo 3

20 Construcción de vectores para la expresión de metY y metAY

3.1 Amplificación de los genes metY y metA

Los genes metA y metY para la biosíntesis de metionina, procedentes de *C. glutamicum*, fueron amplificados usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y unos oligonucleótidos sintéticos. Comenzando a partir de las secuencias de nucleótidos de los genes de biosíntesis de metionina metY (SEQ ID No.1) y metA (entrada en la genoteca con el Número de Acceso AF052652) de *C. glutamicum* ATCC 13032, se sintetizaron unos cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Estos cebadores fueron escogidos de tal manera que los fragmentos amplificados contienen los genes y los sitios de fijación a ribosomas nativos de los mismos, pero no unas posibles regiones de promotores. Además, se introdujeron unos apropiados sitios de corte por restricción que permiten efectuar la clonación dentro del vector diana. Las secuencias de los cebadores de PCR, los sitios de disociación introducidos (secuencia subrayada) y el gen amplificado (el tamaño de fragmento, en pb, se enumera entre paréntesis) se enumeran en la lista de la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

Cebador	Secuencia con el sitio de disociación por restricción	Producto	Plásmido
metY-EVP5	5'-CTAATAAGT <u>CGACA</u> AAAGGAGGACA Sal I ACCATGCCAAAGTACGAC-3'	metY (1.341 pb)	pCREmetY
metY-EVP3	5'-GAGTCTAATGCATGCTAGATTGCA NsiI GCAAAGCCG-3'		
metA-EVP5	5'-AGAACGAATTCAAAGGAGGACAAC EcoRI CATGCCACCCTCGCGC-3'	metA (1.161 pb)	pCREmetA
metA-EVP3	5'-GTCGTGGATCCCCTATTAGATGTA PstI GAACTCG-3'		

Los experimentos de PCR se llevaron a cabo con la polimerasa de ADN de Taq procedente de Gibco-BRL (Eggestein, Alemania) en un "PCT-100 Thermocycler" (de MJ Research Inc., Watertown, Mass., EE.UU.). Una única etapa de desnaturalización durante 2 minutos a 94°C fue seguida por una etapa de desnaturalización durante 90 segundos (s) a 94°C, y por una etapa de reanillamiento durante 90 s a una temperatura, dependiente del cebador, de T=(2xAT+4xGC) -5 C (Suggs, y colaboradores, 1981, p. 683-693, en: D.D. Brown, y C.F. Fox (coordinadores de edición), Developmental Biology using Purified Genes [Biología del desarrollo usando genes purificados]. Academic Press, Nueva York, EE.UU) y por una etapa de extensión a 72°C que dura 90 s. Las últimas tres etapas fueron repetidas en forma de un ciclo 35 veces y la reacción fue terminada con una etapa final de extensión durante 10 minutos (min) a 72°C. Los productos amplificados de esta manera fueron ensayados por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %.

El fragmento de metY de 1.341 pb fue disociado con las endonucleasas de restricción Sall y NsiI, y el fragmento de metA con un tamaño de 1.161 pb fue disociado con las endonucleasas de restricción EcoRI y BamHI. Las dos tandas fueron separadas mediante una electroforesis en gel y los fragmentos de metY (aproximadamente 1.330 pb) y de metA (aproximadamente 1.150 pb) fueron aislados a partir del gel de agarosa con el estuche QiaExII Gel Extraction Kit (nº de producto 20021, Qiagen, Hilden, Alemania).

3.2. Clonación de metY en el vector pZ8-1

El vector de expresión en lanzadera de E. coli - C. glutamicum pZ8-1 (documento EP 0 375 889) fue empleado como el vector de base para una expresión tanto en C. glutamicum como en E. coli. El ADN de este plásmido fue disociado por completo con las enzimas de restricción Sall y PstI y luego desfosforilado con una fosfatasa alcalina de gamba (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Descripción del Producto SAP, nº de producto 1758250). El fragmento de metY aislado a partir del gel de agarosa en el Ejemplo 3.1 se mezcló con el vector pZ8-1 preparado de esta manera y la tanda se trató con la ligasa de ADN de T4 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del Producto ligasa de ADN de T4, nº de código 27-0870-04).

La tanda de ligación fue transformada en el seno de la cepa DH5α de E. coli (Hanahan, en: ADN cloning. A Practical Approach [Clonación de ADN. Un enfoque práctico]. Volumen I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, EE.UU.). La selección de las células portadoras de plásmidos se hizo extendiendo en placas la tanda de transformación sobre un agar de LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) con 50 mg/l de kanamicina. Después de una incubación durante una noche a 37°C, se seleccionaron unos clones individuales recombinantes. El ADN de plásmido fue aislado a partir de un transformante con el estuche Qiaprep Spin Miniprep Kit (nº de producto 27106, Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y fue comprobado mediante una disociación por restricción. El plásmido resultante fue denominado pCREmetY. Este es mostrado en la Figura 1.

3.3. Clonación de metA y metY en el vector pZ8-1

El ADN del plásmido pZ8-1 fue disociado por completo con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI y luego desfosforilado con una fosfatasa alcalina de gamba (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Descripción del Producto SAP, nº de producto 1758250). El fragmento de metA aislado a partir del gel de agarosa en el Ejemplo 3.1 fue mezclado con el vector pZ8-1 preparado de esta manera y la tanda se trató con la ligasa de ADN de T4 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del Producto ligasa de ADN de T4, nº de código 27-0870-04).

La tanda de ligación fue transformada en el seno de la cepa DH5α de E. coli (Hanahan, en: DNA cloning. A Practical Approach. volumen I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, EE.UU.). La selección de las células portadoras de plásmidos se hizo extendiendo en placas la tanda de transformación sobre un agar de LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) con 50 mg/l de kanamicina. Después de una incubación durante una noche a 37°C, se seleccionaron unos clones individuales recombinantes. El ADN de plásmido fue aislado a partir de un transformante con el estuche Qiaprep Spin Miniprep Kit (nº de producto 27106, Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y fue comprobado mediante una disociación por restricción. El plásmido resultante fue denominado pCREmetA.

El plásmido pCREmetA fue disociado por completo con las enzimas de restricción Sall y PstI y luego desfosforilado con una fosfatasa alcalina de gamba (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Descripción del Producto SAP, nº de producto 1758250). El fragmento de metY aislado a partir del gel de agarosa en el Ejemplo 3.1 fue mezclado con el vector pCREmetA preparado de esta manera y la tanda se trató con la ligasa de ADN de T4 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del Producto ligasa de ADN de T4, nº de código 27-0870-04).

La tanda de ligación fue transformada en el seno de la cepa DH5α de E. coli (Hanahan, en: ADN cloning. A Practical Approach. volumen I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, EE.UU.). La selección de las células portadoras de plásmidos se hizo extendiendo en placas la tanda de transformación sobre un agar de LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) con 50 mg/l de kanamicina. Después de una incubación durante una noche a 37°C, se seleccionaron unos clones individuales recombinantes. El ADN de plásmido fue aislado a partir de un transformante con el estuche Qiaprep Spin Miniprep Kit (nº de producto 27106, Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y fue comprobado mediante una disociación por restricción. El plásmido resultante fue denominado pCREmetAY. Éste se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 4

Preparación de las cepas DSM5715/pCREmetY y DSM5715/pCREmetAY

5 Los vectores pCREmetY y pCREmetAY mencionados en los Ejemplos 3.2 y 3.3 fueron electroporados mediante el método de electroporación de Tauch y colaboradores (1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) en el seno de *Corynebacterium glutamicum* DSM 5715. La cepa DSM 5715 es una productora de lisina resistente al AEC. La selección de células portadoras de plásmidos se hizo extendiendo en placas la tanda de electroporación sobre un agar de LB (Sambrook y colaboradores Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), que había sido suplementado con 25 mg/l de kanamicina. El ADN de plásmido fue aislado en cada caso a partir de un transformante por métodos convencionales (Peters-Wendisch y colaboradores 1998, Microbiology 144, 915-927) y comprobado mediante una disociación por restricción con una subsiguiente electroforesis en gel de agarosa. Las cepas fueron denominadas DSM5715/pCREmetY y DSM5715pCREmetAY. La cepa DSM5715/pCREmetY ha sido depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (DSMZ = German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania) de acuerdo con el Tratado de Budapest como DSM 13556.

15 **Ejemplo 5 (que no es parte del invento)**

Preparación de lisina con la cepa DSM5715/pCREmetY

La cepa DSM5715/pCREmetY de *C. glutamicum* obtenida en el Ejemplo 4 fue cultivada en un medio nutriente apropiado para la producción de lisina y se determinó el contenido de lisina en el material sobrenadante del cultivo.

20 Para esto, la cepa fue incubada primeramente sobre una placa de agar con el correspondiente antibiótico (agar de cerebro-corazón con kanamicina (50 mg/l)) durante 24 horas a 33°C. Comenzando a partir de este cultivo en placa de agar, se sembró un cultivo preliminar (10 ml de un medio en un matraz cónico con una capacidad de 100 ml). El medio Cg III se usó como el medio para el cultivo preliminar.

Medio Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-peptona	10 g/l
Extracto de levadura Bacto	10 g/l
Glucosa (autoclavada por separado)	2 % (p/v = peso/volumen)

El pH fue llevado al valor de pH 7,4

25 Se añadió kanamicina (50 mg/l) a esto. El cultivo preliminar fue incubado durante 16 horas a 33°C a 240 rpm sobre una máquina sacudidora. Un cultivo principal fue sembrado a partir de este cultivo preliminar de manera tal que la DO (densidad óptica) inicial (a 660 nm) del cultivo principal fuese de 0.1. El medio MM fue usado para el cultivo principal.

30

ES 2 395 747 T3

Medio MM

CSL (de corn steep liquor = líquido de maceración de maíz)	5 g/l
MOPS (de ácido morfolinopropanosulfónico)	20 g/l
Glucosa (autoclavada por separado)	50 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0 mg/l
Biotina (filtrada en condiciones estériles)	0,3 mg/l
Tiamina * HCl (filtrada en condiciones estériles)	0,2 mg/l
L-Leucina (filtrada en condiciones estériles)	0,1 g/l
CaCO ₃	25 g/l

El CSL, el MOPS y la solución de sales se llevaron a un pH de 7 con amoníaco acuoso y se autoclavaron. El substrato estéril y las soluciones de vitaminas se añadieron luego, así como el CaCO₃ se autoclavó en el estado seco.

- 5 La cultivación se lleva a cabo en un volumen de 10 ml en un matraz cónico con una capacidad de 100 ml con deflectores. Se añadió kanamicina (50 mg/l). La cultivación se llevó a cabo a 33°C y con una humedad atmosférica de 80 %.

- 10 Después de 48 horas, la DO fue determinada a una longitud de onda de medición de 660 nm con un Biomek 1000 (de Beckmann Instruments GmbH, München). La cantidad de lisina formada fue determinada con un aparato analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) mediante una cromatografía con intercambio de iones y una derivatización posterior a la columna con detección con ninhidrina.

El resultado del experimento se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Cepa	DO (660)	Lisina HCl g/l
DSM5715	10,6	15,7
DSM5715/pCREmetY	9,5	16,1

15 Ejemplo 6

Preparación de metionina con la cepa DSM5715/pCREmetAY

La cepa de *C. glutamicum* DSM5715/pCREmetAY obtenida en el Ejemplo 4 se cultivó en un medio nutriente apropiado para la producción de metionina y se determinó el contenido de metionina en el material sobrenadante del cultivo.

Para esto, la cepa fue incubada primeramente sobre una placa de agar con el correspondiente antibiótico (agar de cerebro-corazón con kanamicina (50 mg/l)) durante 24 horas a 33°C. Comenzando a partir del cultivo en placa de agar, se sembró un cultivo preliminar (10 ml de medio un matraz cónico con una capacidad de 100 ml). El medio Cg III completo como se describe en el Ejemplo 5 fue usado como el medio para el cultivo preliminar.

5 Se añadió a esto kanamicina (50 mg/l). El cultivo preliminar fue incubado durante 16 horas a 33°C a 240 rpm (revoluciones por minuto) sobre una máquina sacudidora. Un cultivo principal fue sembrado a partir de este cultivo preliminar de manera tal que la DO inicial (a 660 nm) del cultivo principal fuese de 0,1. El medio MM como se describe en el Ejemplo 5 fue usado para el cultivo principal.

10 El CSL, el MOPS y la solución de sales se llevaron a un pH de 7 con amoniaco acuoso y se autoclavaron. El substrato estéril y las soluciones de vitaminas se añadieron luego, así como el CaCO₃ se autoclavó en el estado seco.

La cultivación se lleva a cabo en un volumen de 10 ml en un matraz cónico con una capacidad de 100 ml con deflectores. Se añadió kanamicina (50 mg/l). La cultivación se llevó a cabo a 33°C y con una humedad atmosférica de 80 %.

15 Después de 72 horas, la DO fue determinada a una longitud de onda de medición de 660 nm con un Biomek 1000 (de Beckmann Instruments GmbH, Múnich). La cantidad de metionina formada fue determinada con un aparato analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) mediante una cromatografía con intercambio de iones y una derivatización posterior a la columna con detección por ninhidrina.

El resultado del experimento se muestra en la Tabla 3.

20 Tabla 3

Cepa	DO (660)	Metionina g/l
DSM5715	6,6	1,4
DSM5715/pCREmetAY	8,3	16,0

Breve descripción de las Figuras:

- 25
- Figura 1: Plásmido pCREmetY
 - Figura 2: Plásmido pCREmetAY

ES 2 395 747 T3

Las abreviaturas usadas en las Figuras tienen los siguientes significados:

	Kan:	gen de resistencia a la kanamicina
	metY:	gen metY de <i>C. glutamicum</i>
	metA:	gen metA de <i>C. glutamicum</i>
5	Ptac:	promotor tac
	rrnB-T1T2:	terminador T1T2 del gen rrnB de <i>E. coli</i>
	rep:	origen de replicación codificada por un plásmido para <i>C. glutamicum</i> (de pHM1519)
	BamHI:	sitio de disociación con la enzima de restricción BamHI
	EcoRI:	sitio de disociación con la enzima de restricción EcoRI
10	EcoRV:	sitio de disociación con la enzima de restricción EcoRV
	PstI:	sitio de disociación con la enzima de restricción PstI
	Sall:	sitio de disociación con la enzima de restricción Sall
	XhoI:	sitio de disociación con la enzima de restricción XhoI.

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> Evonik Degussa GmbH

<120> Secuencias de nucleótidos que codifican el gen metY

5

<130> 000053 BT

<140>

<141>

10

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1720

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (200) .. (1.510)

<223> gen rnety

25

<400> 1

```

catcctacac catttagagt ggggctagtc atacccccat aaccctagct gtacgcaatc 60
gatttcaaat cagttgaaa aagtcaagaa aattaccoga gaataaattt ataccacaca 120
gtctattgca atagaccaag ctgttcagta ggggtgcatgg gagaagaatt tcctaataaa 180
aactcttaag gacctccaa atg cca aag tac gac aat tcc aat gct gac cag 232
                Met Pro Lys Tyr Asp Asn Ser Asn Ala Asp Gln
                1             5             10
tgg ggc ttt gaa acc cgc tcc att cac gca ggc cag tca gta gac gca 280
Trp Gly Phe Glu Thr Arg Ser Ile His Ala Gly Gln Ser Val Asp Ala
                15             20             25
cag acc agc gca cga aac ctt ccg atc tac caa tcc acc gct ttc gtg 328
Gln Thr Ser Ala Arg Asn Leu Pro Ile Tyr Gln Ser Thr Ala Phe Val
                30             35             40
ttc gac tcc gct gag cac gcc aag cag cgt ttc gca ctt gag gat cta 376
Phe Asp Ser Ala Glu His Ala Lys Gln Arg Phe Ala Leu Glu Asp Leu
                45             50             55
ggc cct gtt tac tcc cgc ctc acc aac cca acc gtt gag gct ttg gaa 424
Gly Pro Val Tyr Ser Arg Leu Thr Asn Pro Thr Val Glu Ala Leu Glu
                60             65             70             75
aac cgc atc gct tcc ctc gaa ggt ggc gtc cac gct gta gcg ttc tcc 472
Asn Arg Ile Ala Ser Leu Glu Gly Gly Val His Ala Val Ala Phe Ser
                80             85             90

```

ES 2 395 747 T3

tcc gga cag gcc gca acc acc aac gcc att ttg aac ctg gca gga gcg	520
Ser Gly Gln Ala Ala Thr Thr Asn Ala Ile Leu Asn Leu Ala Gly Ala	
95 100 105	
ggc gac cac atc gtc acc tcc cca cgc ctc tac ggt ggc acc gag act	568
Gly Asp His Ile Val Thr Ser Pro Arg Leu Tyr Gly Gly Thr Glu Thr	
110 115 120	
cta ttc ctt atc act ctt aac cgc ctg ggt atc gat gtt tcc ttc gtg	616
Leu Phe Leu Ile Thr Leu Asn Arg Leu Gly Ile Asp Val Ser Phe Val	
125 130 135	
gaa aac ccc gac gac cct gag tcc tgg cag gca gcc gtt cag cca aac	664
Glu Asn Pro Asp Asp Pro Glu Ser Trp Gln Ala Ala Val Gln Pro Asn	
140 145 150 155	
acc aaa gca ttc ttc ggc gag act ttc gcc aac cca cag gca gac gtc	712
Thr Lys Ala Phe Phe Gly Glu Thr Phe Ala Asn Pro Gln Ala Asp Val	
160 165 170	
ctg gat att cct gcg gtg gct gaa gtt gcg cac cgc aac agc gtt cca	760
Leu Asp Ile Pro Ala Val Ala Glu Val Ala His Arg Asn Ser Val Pro	
175 180 185	
ctg atc atc gac aac acc atc gct acc gca gcg ctc gtg cgc ccg ctc	808
Leu Ile Ile Asp Asn Thr Ile Ala Thr Ala Ala Leu Val Arg Pro Leu	
190 195 200	
gag ctc ggc gca gac gtt gtc gtc gct tcc ctc acc aag ttc tac acc	856
Glu Leu Gly Ala Asp Val Val Val Ala Ser Leu Thr Lys Phe Tyr Thr	
205 210 215	
ggc aac ggc tcc gga ctg ggc ggc gtg ctt atc gac ggc gga aag ttc	904
Gly Asn Gly Ser Gly Leu Gly Gly Val Leu Ile Asp Gly Gly Lys Phe	
220 225 230 235	
gat tgg act gtc gaa aag gat gga aag cca gta ttc ccc tac ttc gtc	952
Asp Trp Thr Val Glu Lys Asp Gly Lys Pro Val Phe Pro Tyr Phe Val	
240 245 250	
act cca gat gct gct tac cac gga ttg aag tac gca gac ctt ggt gca	1000
Thr Pro Asp Ala Ala Tyr His Gly Leu Lys Tyr Ala Asp Leu Gly Ala	
255 260 265	
cca gcc ttc ggc ctc aag gtt cgc gtt ggc ctt cta cgc gac acc ggc	1048
Pro Ala Phe Gly Leu Lys Val Arg Val Gly Leu Leu Arg Asp Thr Gly	
270 275 280	
tcc acc ctc tcc gca ttc aac gca tgg gct gca gtc cag ggc atc gac	1096
Ser Thr Leu Ser Ala Phe Asn Ala Trp Ala Ala Val Gln Gly Ile Asp	
285 290 295	
acc ctt tcc ctg cgc ctg gag cgc cac aac gaa aac gcc atc aag gtt	1144
Thr Leu Ser Leu Arg Leu Glu Arg His Asn Glu Asn Ala Ile Lys Val	
300 305 310 315	
gca gaa ttc ctc aac aac cac gag aag gtg gaa aag gtt aac ttc gca	1192
Ala Glu Phe Leu Asn Asn His Glu Lys Val Glu Lys Val Asn Phe Ala	
320 325 330	

ES 2 395 747 T3

```

ggc ctg aag gat tcc cct tgg tac gca acc aag gaa aag ctt ggc ctg 1240
Gly Leu Lys Asp Ser Pro Trp Tyr Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gly Leu
335 340 345

aag tac acc ggc tcc gtt ctc acc ttc gag atc aag ggc ggc aag gat 1288
Lys Tyr Thr Gly Ser Val Leu Thr Phe Glu Ile Lys Gly Gly Lys Asp
350 355 360

gag gct tgg gca ttt atc gac gcc ctg aag cta cac tcc aac ctt gca 1336
Glu Ala Trp Ala Phe Ile Asp Ala Leu Lys Leu His Ser Asn Leu Ala
365 370 375

aac atc ggc gat gtt cgc tcc ctc gtt gtt cac cca gca acc acc acc 1384
Asn Ile Gly Asp Val Arg Ser Leu Val Val His Pro Ala Thr Thr Thr
380 385 390 395

cat tca cag tcc gac gaa gct ggc ctg gca cgc gcg ggc gtt acc cag 1432
His Ser Gln Ser Asp Glu Ala Gly Leu Ala Arg Ala Gly Val Thr Gln
400 405 410

tcc acc gtc cgc ctg tcc gtt ggc atc gag acc att gat gat atc atc 1480
Ser Thr Val Arg Leu Ser Val Gly Ile Glu Thr Ile Asp Asp Ile Ile
415 420 425

gct gac ctc gaa ggc gcc ttt gct gca atc tagctttaa tagactcacc 1530
Ala Asp Leu Glu Gly Gly Phe Ala Ala Ile
430 435

ccagtgccta aagcgctggg ttttctttt tcagactcgt gagaatgcaa actagactag 1590

acagagctgt ccatatacac tggacgaagt tttagtcttg tccaccaga acagcggtt 1650

attttcatgc ccaccctcgc gccttcaggt caacttgaaa tccaagcgat cggatgatgc 1710

tccaccgaag 1720

```

<210> 2

<211> 437

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

```

Met Pro Lys Tyr Asp Asn Ser Asn Ala Asp Gln Trp Gly Phe Glu Thr
1 5 10 15

Arg Ser Ile His Ala Gly Gln Ser Val Asp Ala Gln Thr Ser Ala Arg
20 25 30

Asn Leu Pro Ile Tyr Gln Ser Thr Ala Phe Val Phe Asp Ser Ala Glu
35 40 45

His Ala Lys Gln Arg Phe Ala Leu Glu Asp Leu Gly Pro Val Tyr Ser
50 55 60

Arg Leu Thr Asn Pro Thr Val Glu Ala Leu Glu Asn Arg Ile Ala Ser
65 70 75 80

```

ES 2 395 747 T3

Leu Glu Gly Gly Val His Ala Val Ala Phe Ser Ser Gly Gln Ala Ala
 85 90 95
 Thr Thr Asn Ala Ile Leu Asn Leu Ala Gly Ala Gly Asp His Ile Val
 100 105 110
 Thr Ser Pro Arg Leu Tyr Gly Gly Thr Glu Thr Leu Phe Leu Ile Thr
 115 120 125
 Leu Asn Arg Leu Gly Ile Asp Val Ser Phe Val Glu Asn Pro Asp Asp
 130 135 140
 Pro Glu Ser Trp Gln Ala Ala Val Gln Pro Asn Thr Lys Ala Phe Phe
 145 150 155 160
 Gly Glu Thr Phe Ala Asn Pro Gln Ala Asp Val Leu Asp Ile Pro Ala
 165 170 175
 Val Ala Glu Val Ala His Arg Asn Ser Val Pro Leu Ile Ile Asp Asn
 180 185 190
 Thr Ile Ala Thr Ala Ala Leu Val Arg Pro Leu Glu Leu Gly Ala Asp
 195 200 205
 Val Val Val Ala Ser Leu Thr Lys Phe Tyr Thr Gly Asn Gly Ser Gly
 210 215 220
 Leu Gly Gly Val Leu Ile Asp Gly Gly Lys Phe Asp Trp Thr Val Glu
 225 230 235 240
 Lys Asp Gly Lys Pro Val Phe Pro Tyr Phe Val Thr Pro Asp Ala Ala
 245 250 255
 Tyr His Gly Leu Lys Tyr Ala Asp Leu Gly Ala Pro Ala Phe Gly Leu
 260 265 270
 Lys Val Arg Val Gly Leu Leu Arg Asp Thr Gly Ser Thr Leu Ser Ala
 275 280 285
 Phe Asn Ala Trp Ala Ala Val Gln Gly Ile Asp Thr Leu Ser Leu Arg
 290 295 300
 Leu Glu Arg His Asn Glu Asn Ala Ile Lys Val Ala Glu Phe Leu Asn
 305 310 315 320
 Asn His Glu Lys Val Glu Lys Val Asn Phe Ala Gly Leu Lys Asp Ser
 325 330 335
 Pro Trp Tyr Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Thr Gly Ser
 340 345 350
 Val Leu Thr Phe Glu Ile Lys Gly Gly Lys Asp Glu Ala Trp Ala Phe
 355 360 365
 Ile Asp Ala Leu Lys Leu His Ser Asn Leu Ala Asn Ile Gly Asp Val
 370 375 380
 Arg Ser Leu Val Val His Pro Ala Thr Thr Thr His Ser Gln Ser Asp
 385 390 395 400

ES 2 395 747 T3

Glu Ala Gly Leu Ala Arg Ala Gly Val Thr Gln Ser Thr Val Arg Leu
 405 410 415

Ser Val Gly Ile Glu Thr Ile Asp Asp Ile Ile Ala Asp Leu Glu Gly
 420 425 430

Gly Phe Ala Ala Ile
 435

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de L-metionina, que comprende llevar a cabo las siguientes etapas:

- 5 a) fermentación de bacterias corineformes que producen dicha L-metionina y en las que por lo menos la expresión del gen metY que comprende una secuencia de nucleótidos, que codifica un polipéptido que es idéntico por lo menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 y tiene la actividad de la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa, es intensificada recombinantemente por aumento del número de copias del gen o por uso de un potente promotor en un medio,
- b) concentración de dicha L-metionina en el medio o en las células de las bacterias; y
- 10 c) aislamiento de dicha L-metionina.

2. Un procedimiento para la preparación de un aditivo para piensos de animales que contiene L-metionina, que comprende las etapas de:

- 15 a) fermentar bacterias corineformes que producen dicha L-metionina y en las que por lo menos la expresión del gen metY que comprende una secuencia de nucleótidos, que codifica un polipéptido que es idéntico por lo menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 y tiene la actividad de la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa, es intensificada recombinantemente por aumento del número de copias del gen o por uso de un potente promotor en un medio, para obtener un caldo de fermentación que contiene L-metionina;
- 20 b) eliminar una proporción de 0 a 100 % en peso de la biomasa formada durante la fermentación; y
- c) concentrar el caldo que contiene L-metionina obtenido en la etapa b); y
- d) secar el caldo obtenido de acuerdo con c) para obtener el aditivo para piensos de animales en la deseada forma de polvo o de gránulos.

25 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que se emplea una bacteria corineforme transformada con un vector, y el vector lleva un gen metY que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en por lo menos un 90 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 y tiene la actividad de la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa y opcionalmente de manera adicional el gen metA.

30 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al mismo tiempo se intensifica la expresión de uno o más de los genes escogidos entre el conjunto que consiste en

- 4.1 el gen gap que codifica la glicerol-aldehído 3-fosfato deshidrogenasa,
- 4.2 el gen tpi que codifica la triosa fosfato isomerasa,
- 35 4.3 el gen pgk que codifica la 3-fosfoglicerato cinasa,
- 4.4 el gen pyc que codifica la piruvato carboxilasa,
- 4.5 el gen lysC que codifica una aspartato cinasa resistente a la retroalimentación,
- 4.6 el gen metA que codifica la homoserina O-acetil-transferasa,
- 4.7 el gen metB que codifica la cistationina gamma-sintasa,
- 40 4.8 el gen aecD que codifica la cistationina gamma-liasa, y
- 4.9 el gen glyA que codifica la serina hidroximetil-transferasa.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3 en el que se atenúa(n) uno o más gen(es) escogido(s) entre el conjunto que consiste en

- 5.1 el gen pck que codifica la fosfoenol piruvato carboxicinas,

- 5.2 el gen pgi que codifica la glucosa 6-fosfato isomerasa,
- 5.3 el gen poxB que codifica la piruvato oxidasa,
- 5.4 el gen thrB que codifica la homoserina cinasa,
- 5.5 el gen ilvA que codifica la treonina deshidratasa,
- 5 5.6 el gen thrC que codifica la treonina sintasa, y
- 5.7 el gen ddh que codifica la meso-diamino pimelato D-deshidrogenasa.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5, en el que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona entre el conjunto que consiste en
- a) la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 1, o
- 10 b) por lo menos una secuencia que corresponde a la secuencia a) dentro del alcance de la degeneración del código genético, o
- c) por lo menos una secuencia que se hibrida con la secuencia que es complementaria con respecto a la secuencia a) o b) con una concentración de la sal de 2XSSC y con una temperatura de 50 a 68°C,
- y opcionalmente
- 15 d) unas mutaciones de sentido de función neutra en a).
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5, en el que dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de nucleótidos comprende los nucleótidos 200 a 1.510 de SEQ ID No. 1.
- 20 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 8, en el que dicha bacteria corineforme es del género *Corynebacterium*.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha *Corynebacterium* es de la especie *Corynebacterium glutamicum*.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha *Corynebacterium glutamicum* es la cepa DSM5715/pCREmetY depositada bajo el DSM13556 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemania).

Figura 1: Plásmido pCREmetY

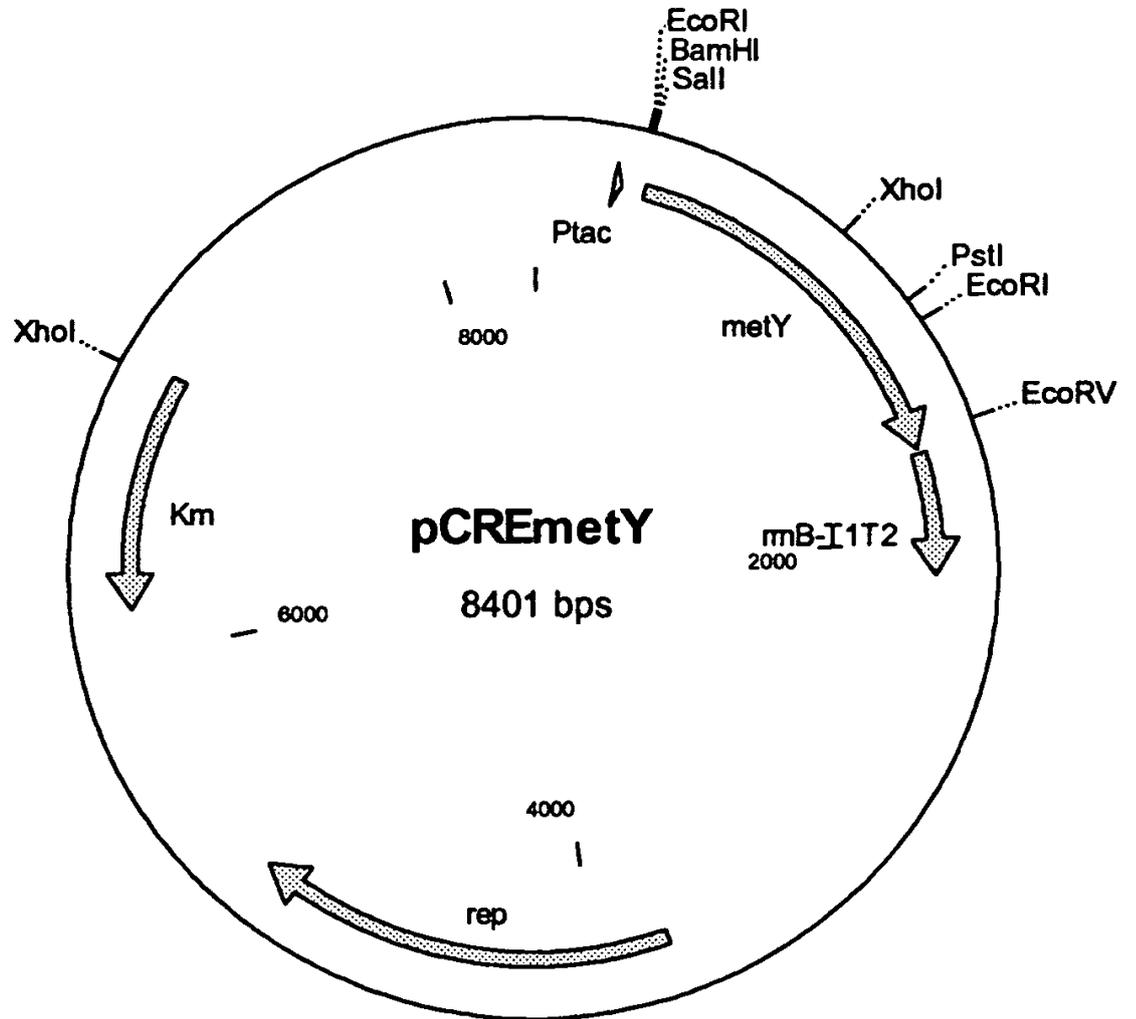


Figura 2: Plásmido pCREmetAY

