



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 448**

51 Int. Cl.:
C12P 13/12 (2006.01)
C12R 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05700860 .9**
96 Fecha de presentación : **13.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1745138**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

54 Título: **Método para la preparación por fermentación de metionina mediante uso de bacterias corineformes recombinantes.**

30 Prioridad: **27.02.2004 DE 10 2004 009 454**

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.10.2010

72 Inventor/es: **Trötschel, Christian;**
Krämer, Reinhard;
Burkovski, Andreas y
Bathe, Brigitte

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.10.2010

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

ES 2 346 448 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

Método para la preparación por fermentación de metionina mediante uso de bacterias corineformes recombinantes.

5 El objeto de la invención es un método para la preparación por fermentación de L-metionina, mediante uso de bacterias corineformes recombinantes, que captan poca o ninguna metionina del medio circundante. Según la invención, esto se logra mediante atenuación, especialmente desactivación, del sistema de captación de metionina Met2, codificado a través de los genes yaeC, abc y yaeE.

10 **Estado de la técnica**

Los compuestos químicos, por medio de lo cual se quiere decir en particular L-aminoácidos, vitaminas, nucleósidos y nucleótidos y D-aminoácidos, encuentran uso en medicina humana, en la industria farmacéutica, en cosméticos, en la industria alimentaria y en alimentación animal.

15 Muchos de estos compuestos se preparan mediante fermentación de microorganismos, preferiblemente a partir de cepas de bacterias corineformes, preparados especialmente a partir del *corynebacterium glutamicum*.

Debido a la gran importancia, se ha llevado a cabo un trabajo a través de la mejora de métodos de fabricación. 20 Las mejoras del proceso pueden implicar características técnicas de la fermentación como, por ejemplo, agitación y suministro de oxígeno o la composición del medio de cultivo tal como, por ejemplo, la concentración de azúcar durante la fermentación o el procesamiento de la producción, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico o las características de producción intrínseca del propio microorganismo.

25 Para la mejora de las características de comportamiento de estos microorganismos, se utilizan los métodos de mutagénesis, selección y elección de mutantes. De esta manera, las cepas que son resistentes a antimetabolitos, como por ejemplo el análogo de lisina S-(2-aminoetil)-cisteína o los análogos de metionina α -metil-metionina, etionina, norleucina, N-acetilnorleucina, S-trifluorometilhomocisteína, ácido 2-amino-5-heptenoico, seleno-metionina, metioninsulfoxamina, metoxina, ácido 1-aminociclopentanocarboxílico, son auxotróficos para metabolitos significativos reguladores y producen L-aminoácidos. 30

Durante varios años se ha empleado la tecnología de ADN recombinante para la mejora de cepas de cepas productoras de aminoácidos de *corynebacterium glutamicum*, en la que se amplifican genes de la biosíntesis de aminoácidos particulares y se investiga el efecto sobre la producción del L-aminoácido.

35 **Objeto de la invención**

Se ha marcado como objetivo proporcionar nuevas bases para métodos mejorados para la preparación mediante fermentación de L-metionina, con bacterias corineformes.

40 **Descripción de la invención**

Más abajo se mencionan L-aminoácidos o aminoácidos, queriendo decir con ello uno o una pluralidad de los aminoácidos proteinogénicos, incluyendo sus sales, seleccionados del grupo de ácido L-aspártico, L-asparagina, L-treonina, L-serina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-arginina, y L-prolina. Se prefiere particularmente L-metionina.

Por aminoácidos proteinogénicos se entiende los aminoácidos que aparecen en proteínas naturales, esto es, en proteínas de microorganismos, plantas, animales y seres humanos. Sirven como entidades estructurales para las proteínas en las que están enlazados entre sí mediante enlaces peptídicos. 50

La L-metionina o metionina mencionada más abajo se refiere también a las sales como, por ejemplo, hidrocloreuro de metionina o sulfato de metionina.

55 La captación de metionina desde el medio de fermentación es muy importante para la producción de metionina, puesto que una posible reabsorción del producto excretado reducirla la tasa de producción. Los genes atenuados yaeE, abc y yaeC descritos en esta invención para *corynebacterium glutamicum* codifican la proteína ABC de unión a ATP y la permeasa YaeE, que juntos forman el sistema de captación de metionina MetD2, para la proteína de unión periplasmática YaeC. 60

La atenuación, y particularmente la desactivación, de uno o una pluralidad de los genes codificantes yaeC, abc y yaeE para el sistema de captación de metionina MetD2 mejora la producción de L-metionina en las bacterias corineformes correspondientes, en comparación con los organismos de partida sin atenuación o desactivación de estos genes. 65

El objeto de la invención es un método para la preparación mediante fermentación de L-metionina mediante uso de bacterias corineformes recombinantes, que en particular ya producen L-aminoácidos que captan menos metionina

ES 2 346 448 T3

que los organismos de partida, o nada de metionina, del medio circundante, y en las cuales una o una pluralidad de la secuencia o secuencias nucleotídicas que codifican yaeC, abc y yaeC del sistema de captación de metionina MetD2 están atenuadas o en particular desactivadas o expresadas a un nivel más bajo.

- 5 Un objeto adicional de la invención es un método para la preparación mediante fermentación de L-metionina, en el que se llevan a cabo las siguientes etapas:
- (a) fermentar la L-metionina produciendo bacterias corineformes recombinantes en un medio, en el que se capta menos metionina que los organismos de partida o no se capta metionina del medio circundante, y en el que al menos se atenúan, y especialmente se desactivan o se expresan en un nivel más bajo, al menos uno de los genes que codifican yaeE, abc y yaeC para el sistema de captación de metionina MetD2,
- 10 (b) enriquecer la L-metionina en el medio o en las células de la bacteria,
- 15 (c) aislar la L-metionina deseada, en la que, opcionalmente, los componentes del caldo de fermentación y/o la biomasa permanecen en porciones (> 0 a 100%) o en sus cantidades totales en el producto final.

20 Las bacterias corineformes producen L-metionina, preferiblemente ya antes de atenuar o desactivar la captación de metionina del medio circundante, lo que se logra por ejemplo atenuando o desactivando uno o una pluralidad de los genes yaeE, abc y yaeC.

Se encontró que los microorganismos, preferiblemente bacterias corineformes, que captan poca o ninguna metionina del medio circundante, lo que se logra atenuando o desactivando uno o una pluralidad de los genes que codifican yaeE, abc y yaeC para el sistema de captación de metionina MetD2, potencian la producción de L-aminoácidos, especialmente L-metionina.

25

Las secuencias nucleotídicas de los genes de *corynebacterium glutamicum* mencionados son conocidas para la técnica anterior más reciente, y se pueden citar diferentes Solicitudes de patentes junto con el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA).

30

Genes yaeC:

- 35 Designación: Proteína de unión periplasmática YaeC
- Función: Parte del sistema de captación de metionina MetD2
- Referencias: Secuencias 7061 y 709 del documento EP1108790
- 40 N° de acceso: AX127145 y AX120793

Genes abc:

- 45 Designación: Proteína de unión a ATP ABC
- Función: Parte del sistema de captación de metionina MetD2
- 50 Referencias: Secuencias 7061, 708, 7060 y 707 del documento EP1108790; Secuencia 363 del documento WO0100805; Secuencia 509 del documento WO010084
- N° de acceso: AX127145; AX120792; AX127144; AX120791; AX0667 81; AX065383

Genes yaeE:

- 55 Designación: Permeasa YaeE
- 60 Función: Parte del sistema de captación de metionina MetD2
- Referencias: Secuencias 7060, 7061 y 706 del documento EP0100805; Secuencia 365 del documento WO0100805
- 65 N° de acceso: AX127144; AX127145; AX120790; AX066783.

ES 2 346 448 T3

Las secuencias que codifican los genes *yaeC*, *abc* y *yaeE* descritos en las localizaciones del texto dadas se pueden usar según la invención. Además, se pueden usar alélicos del gen mencionado, que se dan mediante la naturaleza degenerativa del código genético o mediante “mutaciones de sentido” funcionalmente neutras.

En las reivindicaciones se pueden encontrar realizaciones preferidas.

El término “atenuando” o “atenuar” describe en este contexto la reducción o desactivación de la actividad intracelular de uno o una pluralidad de sistemas enzimáticos, o proteínas en un organismo, que están codificados por el ADN correspondiente, en el que por ejemplo se usa un promotor débil o un gen o alélico, que codifica una enzima correspondiente con una menor actividad o se inactiva el gen o enzima o proteína correspondiente y, si es necesario, se combinan estos rasgos.

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

La expresión “menor” se refiere a los mismos porcentajes observados a la vista de la capacidad de captación de los microorganismos recombinantes, en comparación con los microorganismos de partida sin atenuación o desactivación del sistema de captación de metionina MetD2.

La reducción de la concentración de proteína es detectable mediante una separación proteica común mono y bidimensional y una identificación óptica subsiguiente de la concentración proteica en el gel usando un software de evaluación apropiado. Un método común para la preparación de geles de proteínas para bacterias corineformes y para la identificación de las proteínas es la estrategia descrita en Hermann *et al.* (Electrophoresis, 22:1712-23 (2001)). La concentración de proteína se puede analizar igualmente mediante hibridación por transferencia Western con un anticuerpo específico para la proteína dada (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, (1989)) y la interpretación óptica subsiguiente con el software apropiado para la determinación de la concentración (Lohaus y Meyer (1998) Biospektrum 5:32-39; Lottspeich, Angewandte Chemie 111: 2630-2647 (1999)). La actividad de las proteínas que se unen a ADN se puede medir usando Ensayos de Desplazamiento de Bandas de ADN (también denominado como retardo de gel), como se describe por ejemplo en el libro de texto “Bioanalytik” (Lottspeich/Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Alemania, 1998) y utilizado por Wilson *et al.* (J. Bacteriol. 183: 2151-2155 (2001)). La acción de las proteínas de unión a ADN sobre la expresión de otros genes se puede mejorar usando diferentes métodos bien descritos de los ensayos Reportergen (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning; a Laboratory Manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Los microorganismos que son el objeto de la presente invención pueden producir aminoácidos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidones, celulosa, o a partir de glicerol y etanol. Como agente, pueden estar implicadas las bacterias corineformes, especialmente el género *corynebacterium*. Para el género *corynebacterium*, se menciona *corynebacterium glutamicum*, que se sabe que ejerce su capacidad para producir L-aminoácidos.

Las cepas adecuadas del género *corynebacterium*, especialmente la *corynebacterium* tipo *glutamicum* son especialmente las cepas naturales.

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 y

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

O como ejemplo la cepa productora de L-metionina

Corynebacterium glutamicum ATCC21608.

Las cepas con la denominación “ATCC” se pueden obtener de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

Las cepas con la designación “FERM” se pueden obtener del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japón). La cepa de *Corynebacterium* denominada termoaminogen (FERM BP-1539) se describe en la patente U.S. 5.250.434.

Para obtener la atenuación, tanto la expresión del gen como las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas se pueden degradar o desactivar. Si es necesario se combinan ambas medidas.

La expresión génica se puede disminuir mediante manejo del cultivo adecuado o mediante cambio genético (mutación) de las estructuras de señal de la expresión génica. Las estructuras de señal de la expresión génica son por ejemplo genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de unión a ribosoma, el codón de partida y terminadores. Una persona experta en la técnica puede encontrar información para este fin en la Solicitud de patente WO 96/15246, en las publicaciones de Boyd y Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949-5952 (1988), Vosuil y Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3584-3590 (1998), Patek *et al* (Microbiology 142: 1297-309 (1996), y Journal of Biotechnology 104: 311-323 (2003)) y en libros de textos conocidos de genética y biología molecular tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers “Molekulare Genetik” (Genética Molecular), 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), o el de Winnacker (“Gene und Klone” (Genes y Clones), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania (1990)).

Un ejemplo de la regulación deseada de la expresión génica es la clonación de genes para ser atenuados bajo el control de promotores inducibles mediante adición de cantidades cerradas de promotores inducibles por IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), tales como por ejemplo el promotor trc o el promotor tac. Para este fin, son adecuados los vectores tales como, por ejemplo, el vector de expresión de *Escherichia coli* pXK99E (documento (WO 0226787; presentado según el tratado de Budapest del 31 de julio de 2001 como DH5alfa/pXK99E como DSM14440 en la Asociación Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania) o pVWEx2 (Wendisch, tesis doctoral, Reports of the Jülich Research Center, Jül-33 97, ISSN 0994-2952, Jülich, Alemania (1997)), que hacen posible una expresión dependiente de IPTG del gen clonado en *Corynebacterium glutamicum*.

Este método se incluyó por ejemplo en la patente WO 0226787 para la expresión regulada del gen deaD mediante integración del vector pXK99EdeaD en el genoma de *Corynebacterium glutamicum*, y por Simic *et al.* (Applied and Environmental Microbiology 68: 3321-3327 (2002)) a la expresión regulada del gen glyA mediante integración del vector pK18mobglyA en *Corynebacterium glutamicum*.

Un método adicional para reducir específicamente la expresión génica es la tecnología antisentido, en la que se emplean oligodesoxinucleótidos cortos o vectores en la síntesis de ARN antisentido más largo en las células diana.

Allí, el ARN antisentido se puede unir a segmentos complementarios de ARNm específico y reducir su estabilidad o bloquear su capacidad para bloquear la capacidad translocadora. Una persona experta en la técnica puede encontrar un ejemplo que se refiera a esto en Srivastava *et al.* (Applied Environmental Microbiology, Oct 2000; 66 (10): 4366-4371).

Las mutaciones que conducen a un cambio o reducción de las propiedades catalíticas son conocidas para el estado de la técnica; se mencionan ejemplos en los trabajos de Qiu y Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto *et al* (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) y mencionados por Móckel (tesis doctoral, Berichte des Forschungszentrums Jülich (Jülich Research Center Reports), Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Alemania (1994). Las presentaciones de resumen se pueden encontrar en libros de texto conocidos sobre genética y microbiología, tales como por ejemplo aquellas en Hagemann (“Allgemeine Genetik” (Genética General), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1986).

Las transiciones, transversiones, inserciones y supresiones se tienen en cuenta con las mutaciones. En la dependencia de la acción del intercambio de aminoácidos sobre la actividad enzimática, se debe hablar de “mutaciones de pérdida de sentido” o “mutaciones sin sentido”.

Las inserciones o supresiones de al menos un par de bases en un gen conducen a “mutaciones de desplazamiento del marco”, como consecuencia de lo cual se forman falsos aminoácidos o termina la producción prematuramente. Las supresiones de una pluralidad de codones conducen típicamente a una ruptura completa de la actividad enzimática.

Las instrucciones para la producción de tales mutaciones son estado de la técnica, y se pueden encontrar en libros de texto conocidos de genética y microbiología tales como por ejemplo Knippers (“Molekulare Genetik”) (Genética Molecular), 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), o aquel de Winnacker (“Gene und Klone” (Genes y Clones), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania (1990), o aquel de Hagemann (“Allgemeine Genetik” (Genética General), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1986).

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

En el método de la interrupción génica, por ejemplo, una porción central de la región codificante del gen de interés se clona en un vector plasmídico, el cual se puede replicar en un hospedante (típicamente *E. coli*), pero no en *C. glutamicum*. Los vectores que merece la pena considerar son, por ejemplo, pSUP301 (Simón *et al.*, Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18 mob, pK19mob, pK18mobsacB o pK19mobsacB (Schäfer *et al.*, Gene 145, 69-73 (1994)),

pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, USA, pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Groningen, Países Bajos); Shuman (1994), Journal of Biological Chemistry 269: 32678-84, patente U.S. 5.487.993, pCR®Blunt (Invitrogen, Groningen, Países Bajos); Bernard *et al.*, Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993) o pEM1 (Schrumpf *et al.*, 1991, Journal of Bacteriology 173 4510-4516). El vector plasmídico, que contiene el área central de la región codificante del gen, se convierte subsiguientemente mediante conjugación o transformación en la cepa de *c. glutamicum* deseada. El método de conjugación se describe por ejemplo en Schäfer *et al.* (Journal of Bacteriology 172: 1663-1666 (1990) y Applied and Environmental Microbiology 60: 756-759(1994).

Los métodos de transformación se describen por ejemplo en Thierbach *et al.* (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988), Duncan y Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) y Tauch *et al.* (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)). Tras la recombinación homóloga por medio de un suceso de “entrecruzamiento”, la región codificante del gen en cuestión es interrumpida por la secuencia del vector y se obtienen dos alelos incompletos, cada uno de los cuales carece de los extremos 3' ó 5'. Este método se usó por ejemplo por Fitzpatrick *et al.* (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994) para desactivar el gen *recA* de *c. glutamicum*.

Vectores que contienen al menos 15 y preferiblemente 25 nucleótidos sucesivos de la porción central de la región codificante de al menos uno de los genes *yaeD*, *abc*, o *yaeE*, son igualmente un objeto de la presente descripción.

En el método de “sustitución génica”, se prepara una mutación, tal como por ejemplo una supresión, inserción o sustitución de bases, en el gen de interés *in vitro*. El alelo preparado por otro lado se clona en un vector no replicativo para *c. glutamicum*, y este se convierte subsiguientemente mediante transformación o conjugación en el hospedante deseado de *c. glutamicum*. Tras la recombinación homóloga por medio de una primera integración que provoca el suceso de “entrecruzamiento” y una segunda escisión que efectúa un suceso de “entrecruzamiento” en el gen diana o en la secuencia pretendida, se logra el atrapamiento de la mutación o del alelo. Este método se describe en Scharzer y Pühler Bio/Technology 9: 84-87 (1991), y se usó por ejemplo por Peters-Windisch *et al.* (Microbiology 144, 915-927 (1998), a fin de desactivar el gen *pyc* de *c. glutamicum* mediante una supresión, o por Wehmeier *et al.* (Microbiology 144: 1853-1862 (1998) para la inserción de una supresión en el gen *rel* de *c. glutamicum*.

Kirchner y Tauch (Journal of Biotechnology 104: 287-299 (2003)) proporcionan un repaso de diferentes métodos genéticos para *c. glutamicum*.

De esta manera, se puede construir una inserción o un intercambio de bases en uno o una pluralidad de los genes seleccionados del grupo de *yaeC*, *abc*, y *yaeE*.

Adicionalmente, puede ser ventajoso para la producción de L-aminoácidos, además de disminuir la importación de metionina desde el medio circundante, lograr esto, según la invención, atenuando uno o una pluralidad de los genes seleccionados del grupo de *yaeC*, *abc*, y *yaeE*, una o una pluralidad de enzimas de las rutas biosintéticas respectivas, de glucólisis, de anaplerosis, del ciclo de ácido cítrico, del ciclo de fosfato de pentosa de la exportación de aminoácidos y si es necesario proteínas reguladoras, ya sea para fortalecer, o atenuar, especialmente desactivar o disminuir la expresión.

A este respecto, el término “fortalecimiento” o “fortalecer” describe el incremento en la actividad intracelular o concentración de una o una pluralidad de enzimas o proteínas en un microorganismo, que son codificadas por el ADN correspondiente en el que se incrementa, por ejemplo, el número de copias del gen o del gen, se usa un promotor fuerte o un gen o alelo que para una enzima o proteína correspondiente codifica con una mayor actividad, y si es necesario se combinan estas medidas.

Mediante las medidas de fortalecimiento, especialmente la sobreexpresión, la actividad o concentración de la proteína correspondiente aumenta en general en al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150% 200%, 300%, 400% o 500%, máximo hasta 1000% o 2000% con relación a la de la proteína de tipo natural o la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

En general se prefiere el uso de genes endógenos.

Bajo “genes endógenos” o “secuencias nucleotídicas endógenas” se entiende el tipo de genes o secuencias nucleotídicas presentes en la población.

Así, por ejemplo, para la preparación de L-metionina, además de reducir la importación de metionina desde el medio circundante, según la invención, para lograrlo mediante atenuación de uno o una pluralidad de los genes, seleccionados del grupo de *yaeC*, *abc*, y *yaeE*, se fortalece, especialmente se sobreexpresa, uno o una pluralidad de los genes escogidos del grupo de genes o alelos de la producción de metionina. Bajo “genes o alelos de la producción de metionina” se entienden marcos de lectura abierta todos juntos, preferiblemente endógenos, genes o alelos, cuyo fortalecimiento/sobreexpresión puede conducir a una mejora de la producción de metionina.

Para este fin, pertenecen entre otros los siguientes marcos de lectura, genes o alelos: *accBC*, *accDA*, *aecD*, *cstA*, *cysD*, *cysE*, *cysH*, *cysK*, *cysN*, *cysQ*, *dps*, *eno*, *fda*, *gap*, *gap2*, *gdh*, *gnd*, *glyA*, *hom*, *hom^{FBR}*, *lysC*, *lySC^{FBR}*, *metA*, *metB*, *metE*, *metH*, *metY*, *msiK*, *opcA*, *oxyR*, *ppc*, *ppc^{FBR}*, *pgk*, *pknA*, *pknB*, *pknD*, *pknG*, *ppsA*, *ptsH*, *ptsl*, *ptsM*, *pyc*, *pyc P458S*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigM*, *tal*, *thyA*, *tkl*, *tpi*, *zwal*, *zwf*, y *zwf A213T*. Estos se resumen y explican en la Tabla 1.

Tabla 1

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
accBC	Acil-CoA Carboxilasa EC 6.3.4.14 (acil-CoA carboxilasa)	Jäger et al. Archives of Microbiology (1996) 166:76-82 EP1108790; W00100805	U35023 AX123524 AX066441
accDA	Acetil-CoA Carboxilasa EC 6.4.1.2 (acetil-CoA carboxilasa)	EP1055725 EP1108790 W00100805	AX121013 AX066443
aecD	Cistationina beta-liasa EC 4.4.1.8 (cistationina beta-liasa)	Rossol et al., Journal of Bacteriology 174:2968-2977 (1992)	M89931

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
cstA	Proteína A de falta de carbono (proteína A de falta de carbono)	EP1108790 W0010080	AX120811 AX066109
cysD	Sulfat-Adenylyltransferase Untereinheit II EC 2.7.7.4 (sulfate adenyltransferase catalyzed by small dena)	EP1108790	AX123177
cysE	Serineacetyltransferase EC 2.3.1.30 (serine acetyltransferase)	EP1108790 W00100843	AX122902 AX063961
cysH	3'-phosphoadenylsulfate reductase EC 1.8.99.4 (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase)	EP1108790 W00100842	AX123178 AX066001

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
cysK	Cisteína-reductasa EC 4.2.99.8 (cisteína reductasa)	EP1108790 W00100843	AX122901 AX063963
cysN	Sulfato-Adenililtransferasa Untereinheit I EC 2.7.7.4 (sulfato adenililtransferasa)	EP1108790	AX123176 AX127152
cysQ	Transportprotein CysQ (cysQ transportador)	EP1108790 W00100805	AX12714 5AX066423
dps	Proteína de protección del ADN (protección durante la falta de proteína)	EP1108790	AX127153

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
eno	Enolasa EC 4.2.1.11 (enolasa)	EP1108790 W00100844 EP1090998 Hermann et al., Electrophoresis 19:3217-3221 (1998)	AX127146 AX064945 AX136862
fda	Fructose Bisphosphat Aldolase EC 4.1.2.13 (fructosa bisfosfato aldolasa)	van der Osten et al., Molecular Microbiology 3:1625-1637 (1989)	X17313
gap	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa EC 1.2.1.12 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)	EP1108790 W00100844 Eikmanns et al., Journal of Bacteriology 174: 6076-6086(1992)	AX127148 AX064941 ofX59403

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
gap2	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa EC 1.2.1.12 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2)	EP1108790 W00100844	AX127146 AX064939
gdh	Glutamato Deshidrogenasa EC 1.4.1.4 (glutamato deshidrogenasa) 11	EP1108790 W00100844 Boermann et al., Molecular Microbiology 6:317-326 (1992)	AX127150 AX0638 X59404 X72855
glyA	Glicina/Serina Hidroximetiltransferasa EC 2.1.2.1 (glicina/serina hidroximetiltransferasa)	EP1108790	AX1271 46 AX1211 94

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
gnd	6-Fosfogluconato Deshidrogenasa EC 1.1.1.44 (6-fosfogluconato deshidrogenasa)	EP1108790 W00100844	AX1271 47 AX1216 89 AX0651 25
hom	Homoserina Deshidrogenasa EC 1.1.1.3 (homoserina deshidrogenasa)	Peoples et al., Molecular Microbiology 2:63-72 (1988)	Y00546
hom ^{FBR}	Homoserina Deshidrogenasa resistente a retroalimentación (fbr) EC 1.1.1.3 (homoserina deshidrogenasa fbr)	Reinscheid et al., Journal of Bacteriology 173:3228-30 (1991)	

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
lysC	Aspartato cinasa EC 2.7.2.4 (aspartato cinasa)	EP1108790 WO0100844 Kalinowski et al., Molecular Microbiology 5:1197-204 (1991)	AX1203 65 AX0637 43 X57226
lysC ^{FBR}	Aspartato cinasa resistente a retroalimentación (fbr) EC 2.7.2.4 (aspartato cinasa fbr)	Siehe Tabelle 2	
metA	Homoserina Acetiltransferasa EC 2.3.1.31 (homoserina acetiltransferasa)	Park et al., Molecular Cells 8:286- 94 (1998)	AF052652

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
metB	Cistationina γ -Liasa EC 4.4.1.1 (cistationina gama-sintasa)	Hwang et al., Molecular Cells 9:300- 308 (1999)	AF126953
metE	Homocistein-Metiltransferasa EC 2.1.1.14 (homocisteina metiltransferasa)	EP1108790	AX1271 46 AX1213 45
metH	Homocistein-Metiltransferasa (Vitamin B12 abhängig) EC 2.1.1.14 (homocisteina metiltransferasa)	EP1108790	AX1271 48 AX1217 47
metY	Acetilhomoserina Sulfhidrolasa (acetilhomoserina sulfohidrolasa)	EP1108790	AX1208 10 AX1271 45

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
msiK	Zuckerimporter (proteína de importación de azúcar múltiple)	EP1108790	AX1208 92
opcA	Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa (subunidad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)	W00104325	AX0762 72
oxyR	Regulador de las transcripciones (regulador transcriptional)	EP1108790	AX1221 98 AX1271 49
ppc ^{FBR}	Fosfoenolpiruvato Carboxilasa resistente a retroalimentación EC 4.1.1.31 (fosfoenolpiruvato carboxilasa resistente a retroalimentación)	EP0723011 W00100852	

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
ppc	Fosfoenolpiruvato Carboxilasa EC 4.1.1.31 (fosfoenolpiruvato carboxilasa)	EP1108790 O' Reagan et al., Gene 77(2):237- 251(1989)	AX1271 48 AX123554 M25819
pgk	Fosfoglicerato cinasa EC 2.7.2.3 (fosfoglicerato cinasa)	EP1108790 W0010084 Eikmanns, Journal of Bacteri- ology 174:6076-6086 (1992)	AX1218 38 AX1271 48 AX0649 43 X59403
pknA	Proteína cinasa A (proteína cinasa A)	EP1108790	AX1201 31 AX1200 85
pknB	Proteína cinasa B (proteína cinasa B)	EP1108790	AX1201 30 AX1200 85
pknD	Proteína cinasa D (proteína cinasa D)	EP1108790	AX1271 50 AX1224 69 AX1224 68

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
pknG	Proteína cinasa G (proteína cinasa G)	EP1108790	AX1271 52 AX1231 09
ppsA	Fosfoenolpiruvato-Sintasa EC 2.7.9.2 (fosfoenolpiruvato sintasa)	EP1108790	AX1271 44 AX1207 00 AX1224 69
ptsH	Proteína H del sistema de fosfo-transferasa EC 2.7.1.69 (componente H del sistema de fosfotransferasa)	EP1108790 W00100844	AX1222 10 AX1271 49 AX0691 54

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
pts1	Enzima I del sistema de fosfo-transferasa EC 2.7.3.9 (enzima I del sistema de fosfo-transferasa fosfotransferasa)	EP1108790	AX1222 06 AX1271 49
ptsM	Enzima II del sistema de fosfo-transferasa específico del glucosa EC 2.7.1.69 (enzima II del sistema de glucosa.fosfotransferasa)	Lee et al., FEMS Microbiology Letters 119(1-2):137-145 (1994)	L18874

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
pyc	Piruvato-Carboxilasa EC 6.4.1.1 (piruvato carboxilasa)	W09918228 Peters-Wendisch et al., Microbiology 144:915-927 (1998)	A97276 Y09548
pyc P458S	Piruvato-Carboxilasa EC 6.4.1.1 (piruvato carboxilasa) Intercambio de aminoácido P458S	EP1108790	
sigC	Factor sigma C EC 2.7.7.6 (factor sigma C alternativo de la función extracitoplásmica)	EP1108790	AX120368 AX120085

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
sigD	Factor sigma D de ARN polimerasa EC 2.7.7.6 (Factor sigma de ARN polimerasa)	EP1108790	AX120753 AX127144
sigE	Factor sigma E EC 2.7.7.6 (factor sigma E alternativo de la función extracitoplásmica)	EP1108790	AX127146 AX121325
sigH	Factor sigma H EC 2.7.7.6 (sigma factor SigH)	EP1108790	AX127145 AX120939
sigM	Factor sigma M EC 2.7.7.6 (sigma factor SigM)	EP1108790	AX123500 AX127153

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
tal	Transaldolasa EC 2.2.1.2 (transaldolasa)	W00104325	AX076672
thyA	Timidilato Sintasa EC 2.1.1.45 (timidilato sintasa)	EP1108790	AX121026 AX1271 45
tkt	Transcetolasa EC 2.2.1.1 (transcetolasa)	Ikeda et al., NCBI	AB023377
tpi	Triosa-fosfato Isomerasa EC 5.3.1.1 (triosa-fosfato isomerasa)	Eikmanns, Journal of Bacteriology 174:6076-6086 (1992) X59403	
zwa1	Zellwachstumsfaktor 1 (factor de crecimiento 1)	EP11111062	AX1337 81

Genes y alelos en la producción de metionina			
Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
zwf	Glucosa-6-fosfato-1-Deshidrogenasa EC 1.1.1.49 (glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa)	EP1108790 W0010432	AX127148 AX121827 AX0762 72
zwf A213T	Glucosa-6-fosfato-1-Deshidrogenasa EC 1.1.1.49 (glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa) Intercambio de aminoácido A213T	EP1108790	

ES 2 346 448 T3

Además, puede ser ventajoso para la producción de L-metionina, además de reducir la importación de metionina desde el medio circundante, lograrla atenuando uno o una pluralidad de los genes seleccionados del grupo de 5 yaeC, abc, y yaeE, al mismo tiempo atenuando uno o una pluralidad de los genes seleccionados del grupo de genes o alelos, que no son esenciales para el crecimiento o producción de metionina, y especialmente desactivando o reduciendo la expresión.

Los siguientes marcos de lectura abierta pertenecen entre otros para este fin: brnQ, ccpA1, ccpA2, citA, citB, citE, ddh, gluA, gluB, gluC, gluD, luxR, luxS, lysR1, lysR2, lysR3, menE, metD, metK, pck, pgc, poxB y zwa2. En la Tabla 2 se resumen y se explican.

TABLA 2

Genes y alelos, que no son esenciales para la producción de metionina			
Nombre del Gen	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
brnQ	Carrier-Protein verzweigtkettiger Aminoskren (proteína portadora del sistema de transporte de aminoácidos ramificados)	Tauch et al., Archives of Microbiology 169(4): 303-12(1998) W00100805 EP1108790	M89931 AX066841 AX127150
ccpA1	Katabolit-Kontroll-Protein (Proteína A1 de control de catabolitos)	W00100844 EP1108790	AX065267 AX127147
ccpA2	Katabolit-Kontroll-Protein (Proteína A2 de control de catabolitos)	W00100844 EP1108790	AX065267 AX121594

ES 2 346 448 T3

Genes y alelos, que no son esenciales para la producción de metionina			
Nombre del Gen	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
citA	Sensor-Kinase CitA (sensor cinasa CitA)	EP1108790	AX120161
citB	Transkriptionsregulator CitB (regulador de la transcripción CitB)	EP1108790	AX120163
cite	Citrat-Lyase EC 4.1.3.6 (citrato liasa)	W0010084 EP1108790	AX065421 AX127146
Ddh	Diaminopimelat-Dehydrogenase EC 1.4.1.16 (diaminopimelato deshidrogenasa)	lshino et al., Nucleic Acids Research 15: 3917 (1987) EP1108790	S07384 AX127152
gluA	Glutamat-Transport ATP-bindendes Protein (proteína de unión a ATP del transporte de glutamato)	Kronemeyer et al., Journal of Bacteriology 177(5):1152-8 (1995)	X81191
gluB	Glutamat-bindendes Protein (proteína de unión a glutamato)	Kronemeyer et al., Journal of Bacteriology 177(5):1152-8 (1995)	X81191
gluC	Glutamat-Transport Permease (permeasa del sistema de transporte de glutamato)	Kronemeyer et al., Journal of Bacteriology 177(5):1152-8 (1995)	X81191
gluD	Glutamat-Transport Permease (permeasa del sistema de transporte de glutamato)	Kronemeyer et al., Journal of Bacteriology 177(5):1152-8 (1995)	X81191

ES 2 346 448 T3

Genes y alelos, que no son esenciales para la producción de metionina			
Nombre del Gen	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
luxR	Transkriptionsregulator LuxR (regulador de la transcripción LuxR)	W00100842 EP1108790	AX065953 AX123320
luxS	Histidin-Kinase LuxS (histidina cinasa LuxS)	EP1108790	AX123323 AX127153
lysR1	Transkriptionsregulator LysR1 (regulador de la transcripción LysR1)	EP1108790	AX064673 AX127144
lysR2	Transkriptionsaktivator LysR2 (regulador de la transcripción LysR2)	EP1108790	AX123312
lysR3	Transkriptionsregulator LysR3 (regulador de la transcripción LysR3)	W00100842 EP1108790	AX065957 AX127150
menE	O-Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase EC 6.2.1.26 (O-succinilbenzoato-CoA-ligasa)	W00100843 EP1108790	AX064599 AX064193 AX127144
metD	Transkriptionsregulator MetD (regulador de la transcripción MetD)	EP1108790	AX123327 AX127153

ES 2 346 448 T3

Genes y alelos, que no son esenciales para la producción de metionina			
Nombre del Gen	Designación de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
metK	Methionin-Adenosyl-Transferase EC 2.5.1.6 (S-adenosilmetionina sintetasa)	W00100843 EP1108790	AX063959 AX127148
Pck	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (fosfoenolpiruvato carboxicinasa)	W00100844	AJ269506 AX065053
Pgi	Glucose-6-Phosphat-Isomerase EC 5.3.1.9 (glucosa-6-fosfato isomerasa)	EP1087015 EP1108790	AX136015 AX127146
poxB	Pyruvat-Oxidase EC 1.2.3.3 (piruvato oxidasa)	W00100844 EP1096013	AX064959 AX137665
zwa2	Zellwachstumsfaktor 2 (factor de crecimiento 2)	EP1106693 EP1108790	AX113822 AX127146

Finalmente, puede ser ventajoso para la producción de aminoácidos, especialmente L-metionina, además de disminuir la importación de metionina desde el medio circundante, por ejemplo, lograr esto atenuando uno o una pluralidad de los genes, seleccionados del grupo de yaeC, abc, y yaeE, para imposibilitar reacciones secundarias indeseables (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms" en: Overproduction of Microbial Products, Krump-hanzl, Sikyta, Vanek (eds.) Academic Press, Londres, UK, 1982).

Los microorganismos preparados según la invención son igualmente un objeto de la invención y se pueden cultivar continua o discontinuamente en procesos por lotes o en procesos de alimentación discontinua o de alimentación discontinua repetida, con el fin de producir L-aminoácidos. Un sumario de métodos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de by Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik), (Bioprocess Technology 1. Introduction to Bioprocess Technology) (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1991) o en Lehrbuch von Storhas, Bioreactoren und Periphere Einrichtungen (Libro de texto de Storhas, (Bioreactors and Ancillary Equipment) (Viewweg Publishers, Braunschweig/Wiesbaden (1994)).

El medio de cultivo a usar debe satisfacer de manera adecuada las reivindicaciones de las cepas apropiadas. Las descripciones de medio de cultivo de diferentes microorganismos están contenidas en el libro de texto "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, (1981)).

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

Como fuentes de nitrógeno, se pueden usar compuestos que contienen nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, extracto de maíz, extracto de haba de soja, y urea o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio.

Como fuente de fósforo, se puede usar ácido fosfórico, hidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato dipotásico, o las sales correspondientes que contienen sodio. El medio de cultivo debe contener además sales metálicas que son necesarias para el crecimiento, tales como, por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Finalmente, además de los materiales mencionados anteriormente, se añaden materiales para el crecimiento tales como aminoácidos y vitaminas. También se pueden añadir al medio de cultivo precursores adecuados. Los materiales aditivos se pueden añadir al cultivo en forma de cargas individuales, o se pueden alimentar de una manera adecuada durante el proceso de cultivo.

Para el control del pH del cultivo, se pueden emplear de manera adecuada compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o agua amoniacal, o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para el control de la espumación, se emplean agentes antiespumantes tales como, por ejemplo, ésteres de poliglicol con ácidos grasos. Para mantener la estabilidad de los plásmidos, se pueden añadir al medio materiales que actúan selectivamente, tales como antibióticos. Para mantener las condiciones aerobias, se pueden alimentar en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como aire. La temperatura del cultivo normalmente está entre 20 y 45°C, y preferiblemente entre 25 y 40°C. El proceso de cultivo se continúa hasta que se haya formado una cantidad máxima del producto deseado.

Este objetivo se logrará normalmente en 10 a 160 horas.

Con los métodos de la invención, se puede mejorar el resultado de las bacterias o del proceso de fermentación en relación con la concentración del producto (producto por volumen unitario), el rendimiento del producto (producto formado por fuente de carbono utilizada), la formación de producto (producto formado por volumen unitario y tiempo) u otro parámetro del proceso y sus combinaciones en al menos 0,5%, al menos 1%, o al menos 2%.

Los métodos para la determinación de L-aminoácidos son conocidos en la técnica. Los análisis se pueden realizar como se describe en Spackmann *et al.* (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1185-1190) mediante cromatografía de intercambio aniónico con derivatización con ninhidrina subsiguiente, o se pueden realizar mediante HPLC de fase inversa como se describe en Lindroth *et al.* (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174). Los expertos en la técnica también encontrarán información sobre esto en Ashman *et al.* (en Tschesche (Hrsg), Modern Methods in Protein Chemistry, 155-172, de Gruyter, Berlín 1985).

El proceso según la invención sirve para la producción de L-metionina por fermentación.

La concentración de L-metionina en el producto final se puede aproximar si es necesario mediante adición de L-metionina hasta el nivel deseado.

REIVINDICACIONES

5 1. Método para la preparación de L-metionina mediante fermentación de bacterias corineformes recombinantes en el que se atenúa o atenúan uno o una pluralidad de los genes yaeC, abc y yaeE, que codifican el sistema de absorción de metionina MetD2, en el que el gen yaeC codifica la proteína de unión periplasmática YaeC; el gen abc codifica una proteína de unión a ATP ABC, y el gen yaeE codifica una permeasa YaeE.

10 2. El procedimiento para la preparación mediante fermentación de L-metionina según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

- a) enriquecer L-metionina en el medio o en las células bacterianas, y
- 15 b) aislar dicho L-aminoácido, en el que opcionalmente los componentes del caldo de la fermentación y/o la biomasa permanecen en su totalidad o porciones en el producto final.

20 3. El método según las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque se reduce la expresión del polinucleótido o polinucleótidos que codifica o codifican componentes de la captación de metionina desde el medio circundante, seleccionados de los genes yaeC, abc y yaeE, que codifican el sistema de captación de metionina.

25 4. El método según las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque se disminuye la regulación y/o propiedades catalíticas de los polipéptidos (proteínas enzimáticas), para los cuales codifican los polinucleótidos yaeC, abc y yaeE.

5. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque para la preparación de L-metionina se hacen fermentar bacterias corineformes en las que al mismo tiempo se fortalece, especialmente se sobreexpresa, uno o una pluralidad de los genes seleccionados del grupo enumerado en la Tabla 1:

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 346 448 T3

Nombre	Designación de las enzimas o proteínas codificadas
accBC	Acyl-CoA Carboxilase EC 6.3.4.14 (acil-CoA carboxilasa)
accDA	Acetyl-CoA Carboxilase EC 6.4.1.2 (acetil-CoA carboxilasa)
aecD	Cystathionin beta-Lyase EC 4.4.1.8 (cistationina beta-liasa)
cstA	Carbon Starvation Protein A (proteína A de falta de carbono)
cysD	Sulfat-Adenylyltransferase Untereinheit II EC 2.7.7.4 (sulfato adenililtransferasa cadena pequeña)
cysE	Serinacetiltransferase EC 2.3.1.30 (serina acetiltransferasa)
cysH	3'-Phosphoadenylylsulfat Reduktase EC 1.8.99.4 (3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato reductasa)
cysK	Cystein-Synthase EC 4.2.99.8 (cisteína sintasa)

ES 2 346 448 T3

5	cysN	Sulfat-Adenylyltransferase Untereinheit I EC 2.7.7.4 (sulfato adenililtransferasa)
10	CysQ	Transportprotein CysQ (transportador cysQ)
15	Dps	Proteína de protección de ADN (protección durante la falta de proteína)
20	Eno	Enolase EC 4.2.1.11 (enolasa)
25	Fda	Fructose Bisphosphat Aldolase EC 4.1.2.13 (fructosa bisfosfato aldolasa)
30	Gap	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase EC 1.2.1.12 (gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa)
35	gap2	Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase EC 1.2.1.12 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2)
40	Gdh	Glutamat Dehydrogenase EC 1.4.1.4 (glutamato deshidrogenasa)
45	glyA	Glycine/Serin Hydroxymethyltransferase EC 2.1.2.1 (glicina/serina hidroximetiltransferasa)
50	Gnd	6-Phosphogluconat Dehydrogenase EC 1.1.1.44 (6-fosfogluconato deshidrogenasa)
55		
60	Hom	Homoserin Dehydrogenase EC 1.1.1.3 (homoserina deshidrogenasa)
65		

ES 2 346 448 T3

5	hom ^{FBR}	Homoserin Dehydrogenase feedback resistant (fbr) EC 1.1.1.3 (homoserina deshidrogenasa fbr)
10	lysC	Aspartatkinase EC 2.7.2.4 (aspartato cinasa)
15	lysC ^{FBR}	Aspartatkinase feedback resistant (fbr) EC 2.7.2.4 (aspartato cinasa fbr)
20	metA	Homoserin Acetiltransferase EC 2.3.1.31 (homoserina acetiltransferasa)
25	metB	Cystathionin γ -Lyase EC 4.4.1.1 (cistationina gama-sintasa)
30	metE	Homocystein-Methyltransferase EC 2.1.1.14 (homocisteína metiltransferase)
35	Meth	Homocystein-Methyltransferase (Vitamina B12 abhángig) EC 2.1.1.14 (homocisteína metiltransferasa)
40	metY	Acetilhomoserin Sulfhidrolase (acetilhomoserina sulfhidrolasa)
45	msiK	Zuckerimporter (proteína importadora de azúcar múltiple)
50	opCA	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (subunidad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)
55	oxyR	Transcriptionsregulator (regulador transcripcional)
60	ppc ^{FBR}	Phosphoenolpyruvat Carboxilasa feedback resistant
65		

ES 2 346 448 T3

5		EC 4.1.1.31 (fosfoenolpiruvato carboxilasa resistente a re- troalimentación)
10	Ppc	Phosphoenolpyruvat Carboxilase EC 4.1.1.31 (fosfoenolpiruvato carboxilasa)
15	Pgk	Phosphoglycerat Kinase EC 2.7.2.3 (fosfoglicerato cinasa)
20	pknA	Protein kinase A (proteína cinasa A)
25	pknB	Protein kinase B (proteína cinasa B)
30	pknD	Protein kinase D (proteína cinasa D)
35	pknG	Protein kinase G (proteína cinasa G)
40	ppsA	Phosphoenolpyruvat-Synthase EC 2.7.9.2 (fosfoenolpiruvato sintasa)
45	ptsH	Phosphotransferase System. Protein H EC 2.7.1.69 (componente H del sistema de fosfotransferasa)
50	PtsI	Phosphotransferase System. Enzym I EC 2.7.3.9 (enzima I del sistema de fosfotransferasa)
55	ptsM	Glukose spezifisches Phosphotransferase System En- zym II EC 2.7.1.69 (enzima II del sistema de glucosa- fosfotransferasa)

65

ES 2 346 448 T3

5	Pyc	Pyrvat-Carboxilase EC 6.4.1.1 (piruvato carboxilasa)
10	pyc P458S	Pyrvat-Carboxilase EC 6.4.1.1 (piruvato carboxilasa) Intercambio de aminoácido P458S
15	sigC	Sigmafaktor C EC 2.7.7.6 (factor sigma C alternativo de la función extraci- toplásmica)
20	sigD	RNA Polymerase Sigmafaktor D EC 2.7.7.6 (factor sigma de ARN polimerasa)
25	sigE	Sigmafaktor E EC 2.7.7.6 (factor sigma E alternativo de la función extraci- toplásmica)
30	sigH	Sigmafaktor H EC 2.7.7.6 (factor sigma SigH)
35	sigM	Sigmafaktor M EC 2.7.7.6 (factor sigma SigM)
40	Tal	Transaldolase EC 2.2.1.2 (transaldolasa)
45	thyA	Thymidylat Synthase EC 2.1.1.45 (timidilato sintasa)
50		
55		
60		

ES 2 346 448 T3

5	Tkt	Transketolase EC 2.2.1.1 (transcetolasa)
10	Tpi	Triose-phosphat Isomerase EC 5.3.1.1 (triosa-fosfato isomerasa)
15	zwa1	Zellwachstumsfaktor 1 (factor de crecimiento 1)
20	Zwf	Glukose-6-phosphat-1-Dehydrogenase EC 1.1.1.49 (glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa)
25	zwf A213T	Glukose-6-phosphat-1-Dehydrogenase EC 1.1.1.49 (glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa) aminoácido A213T
30		

35 6. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque para la preparación de L-metionina se fermentan microorganismos corineformes en los que al mismo tiempo se atenúa uno o una pluralidad de genes, seleccionados del grupo enumerado en la Tabla 2:

40	Nombre del gen	Designación de las enzimas o proteínas codificadas
45	brnQ	Carrier-Protein verzweigtkettiger Aminosäuren (proteína portadora del sistema de transporte de aminoácidos ramificados)
50	ccpA1	Katabolit-Kontroll-Protein (Proteína A1 de control de catabolitos)

ES 2 346 448 T3

ccpA2	Katabolit-Kontroll-Protein (Proteína A2 de control de catabolitos)
citA	Sensor-Kinase CitA (sensor cinasa CitA)
citB	Transkriptionsregulator CitB (regulador de la transcripción CitB)
citE	Citrat-Lyase EC 4.1.3.6 (citrato liasa)
Ddh	Diaminopimelat-Dehydrogenase EC 1.4.1.16 (diaminopimelato deshidrogenasa)
gluA	Glutamat-Transport ATP-bindendes Protein (proteína de unión a ATP del transporte de glutamato)
gluB	Glutamat-bindendes Protein (proteína de unión a glutamato)
gluC	Glutamat-Transport Permease (permeasa del sistema de transporte de glutamato)
gluD	Glutamat-Transport Permease (permeasa del sistema de transporte de glutamato)
luxR	Transkriptionsregulator LuxR (regulador de la transcripción LuxR)
luxS	Histidin-Kinase LuxS (histidina cinasa LuxS)
lysR1	Transkriptionsregulator LysR1 (regulador de la transcripción LysR1)

ES 2 346 448 T3

lysR2	Transkriptionsaktivator LysR2 (regulador de la transcripción LysR2)
lysR3	Transkriptionsregulator LysR3 (regulador de la transcripción LysR3)
menE	O-Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase EC 6.2.1.26 (O-succinilbenzoato-CoA-ligasa)
metD	Transkriptionsregulator MetD (regulador de la transcripción MetD)
metK	Methionin-Adenosyl-Transferase EC 2.5.1.6 (S-adenosilmetionina sintetasa)
Pck	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (fosfoenolpiruvato carboxicina)
Pgi	Glucose-6-Phosphat-Isomerase EC 5.3.1.9 (glucosa-6-fosfato isomerasa)
poxB	Pyruvat-Oxidase EC 1.2.3.3 (piruvato oxidasa)
zwa2	Zellwachstumsfaktor 2 (factor de crecimiento 2)

7. El método según una o una pluralidad de reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque se emplean microorganismos del tipo *corynebacterium glutamicum*.

8. Bacteria corineforme recombinante, en la que uno o una pluralidad de los genes, seleccionados del grupo de yaeC, abc y yaeE, que codifican la captación de metionina desde el medio circundante, codifican el sistema de captación de metionina MetD2, se atenúa o atenúan, en comparación con el organismo de partida sin el sistema de captación de metionina MetD2 atenuado, en la que el gen yaeC codifica una proteína de unión periplasmática YaeC; el gen abc codifica una proteína de unión a ATP ABC, y el gen yaeE codifica una permeasa YaeE.