

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 261**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2007 E 07775377 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2132306**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de producción de metionina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.04.2013**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
CJ BLDG. 500 NAMDAEMUNNO 5-GA JUNG-GU  
SEOUL 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**BRAZEAU, BRIAN;  
CHANG, JIN-SOOK;  
CHO, KWANG, MYUNG;  
CHO, YOUNG, WOOK;  
DESOUZA, MERVYN;  
JESSEN, HOLLY, J.;  
KIM, SO-YOUNG;  
NIU, WEI;  
SANCHEZ-RIERA, FERNANDO, A.;  
SHIN, YONG-UK y  
UM, HYEWON**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 400 261 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

Composiciones y procedimientos de producción de metionina.

## 5 CAMPO

**[0001]** Se desvelan composiciones, como microorganismos, enzimas y productos químicos, así como procedimientos para usar los mismos para producir metionina y productos relacionados.

## 10 ANTECEDENTES

**[0002]** La metionina es un aminoácido esencial en la dieta animal. La metionina se ha producido sintéticamente durante un amplio periodo de tiempo mediante varias síntesis químicas de etapas múltiples que emplean acroleína, metil-mercaptano y cianuro como materiales de partida. Existen dos formas del producto: D,L-metionina y su análogo hidróxido. La D-metionina se convierte en el isómero L requerido *in vivo*, a diferencia de todos los demás aminoácidos. Se ha comunicado que el mercado de metionina con calidad para pienso está mejorando debido a una creciente demanda en los suplementos para aves de corral y más recientemente para el ganado porcino. La capacidad de los principales productores de metionina (Degussa AG, Adisseo y Novus) de cumplir con las demandas del mercado gira en torno a los suministros de materias primas. Los productos intermedios acroleína y metil-mercaptano deben ser convertidos en 3-metilpropionaldehído (MMP) y posteriormente en metionina usando hidrogenocianuro. Los tres productores tienen planes para ampliar sus instalaciones de producción de metionina y también de integración con producción de materias primas (Chem. Marketing Reporter, 7 de abril de 2003).

**[0003]** Las vías biosintéticas para la metionina (un miembro de la familia de aminoácidos de aspartato) han sido objeto de estudio en diversos organismos y muestran tanto semejanzas como diferencias. La primera etapa dedicada, la acilación de homoserina es catalizada por la homoserina-aciltransferasa, y es ubicua en todos los organismos a pesar de las diferencias en el grupo acilo transferido. El producto de la catálisis de *metA* es acetilhomoserina o succinilhomoserina. La acilhomoserina se convierte a continuación en homocisteína por medio de una vía de transulfuración o una sulfhidrilación directa. Se ha comunicado que las dos vías están presentes y funcionales en levaduras, hongos, plantas verdes y en la bacteria *Corynebacterium glutamicum*. *E. coli* posee sólo la vía de la transulfuración. La vía de la transulfuración pasa por la cistationina como producto intermedio y usa cisteína como donador de azufre. La vía de sulfhidrilación directa supone la incorporación directa de sulfuro a la acilhomoserina. La última etapa de la vía supone la conversión de homocisteína en metionina catalizada por una homocisteína-metiltransferasa, codificada por los genes *metE* o *metH*.

**[0004]** Otros aminoácidos importantes, como lisina, treonina y triptófano, son producidos por medio de fermentación para su uso en pienso animal. Por tanto, estos aminoácidos pueden prepararse usando glucosa y otros recursos renovables como materiales de partida. Por desgracia, la producción de metionina por medio de fermentación no ha resultado tan provechosa y hoy en día sigue usándose la síntesis química de metionina. Esto se debe en parte a la falta de una vía biosintética eficaz diseñada por ingeniería para la producción de metionina, y un hospedador para la producción adecuado.

**[0005]** El documento WO-2007/011.939 se refiere al uso de disulfuro de dimetilo para producción de metionina en microorganismos.

**[0006]** La siguiente descripción proporciona una vía biosintética de la metionina mejorada, así como un hospedador para la producción.

## 50 RESUMEN

**[0007]** El objeto para el cual se pretende obtener protección es el que se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona una *E. coli* aislada para producir metionina, comprendiendo la *E. coli* aislada:

55 uno o más primeros péptidos que comprenden la actividad de sulfhidrilación directa de homocisteína-sintasa, en el que los péptidos usan O-acetil-L-homoserina (OAHS) u O-succinil-L-homoserina (OSHS) como sustrato;

60 uno o más segundos péptidos que comprenden la actividad de transulfuración de cistationina- $\gamma$ -sintasa y cistationina- $\beta$ -liasa; y

un péptido de homoserina-O-succiniltransferasa que comprende las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10,

en el que la actividad de sulfhidrilación directa procede de la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos exógena que codifica homocisteína-sintasa.

**[0008]** La invención proporciona además un procedimiento para preparar metionina que comprende:

5 cultivo de la *E. coli* aislada de la invención en condiciones que permiten la producción de metionina; y aislamiento de la metionina.

**[0009]** La producción de metionina y los productos relacionados, como S-adenosilmetionina (SAME), por fermentación se describen en la presente memoria descriptiva. También se describen los microorganismos que han sido diseñados por ingeniería genética para incluir moléculas de ADN recombinantes y producir metionina.

**[0010]** Se describe un microorganismo que incluye una secuencia de ácidos nucleicos exógena que codifica un péptido que tiene actividad de sulfhidrilación directa (EC 2.5.1.49, EC 4.2.99-), y secuencias de ácidos nucleicos endógenas que codifican péptidos que tienen actividad de transulfuración (EC 2.5.1.48 y 4.4.1.8). Este microorganismo puede producir metionina y productos relacionados. En algunos ejemplos, el microorganismo puede tener al menos 0,1, 1, 2, 5, 10, 50, 75, 90, o al menos 100 g/l de concentración extracelular de metionina o SAME.

**[0011]** En algunos ejemplos, la presencia de más de una vía biosintética de la metionina permite al organismo producir más metionina de la que sería producida en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos exógena que codifica el péptido que tiene actividad de sulfhidrilación directa.

**[0012]** En otros ejemplos, pueden estar activas más de dos vías biosintéticas de metionina en el organismo. En estos ejemplos una o más secuencias de ácidos nucleicos exógenas codifican para péptidos que tienen actividad de sulfhidrilación directa. Uno de estos péptidos puede usar O-succinilhomoserina como sustrato y otro péptido puede usar O-acetilhomoserina como sustrato.

**[0013]** En algunos ejemplos, los microorganismos diseñados por ingeniería para preparar metionina y productos relacionados, como SAME, producen al menos el 10% de la metionina a partir de la actividad de la vía biosintética de transulfuración. En otros ejemplos producen al menos el 20, el 30, el 40 o al menos el 50% del producto a partir de la actividad de la vía biosintética de transulfuración.

**[0014]** En algunos ejemplos, los microorganismos diseñados por ingeniería para preparar metionina y productos relacionados, como SAME, producen al menos el 10% de la metionina de la actividad de la vía biosintética de sulfhidrilación directa. En otros ejemplos producen al menos el 20, el 30, el 40 o al menos el 50% del producto a partir de la actividad de la vía biosintética de sulfhidrilación directa.

**[0015]** En algunos ejemplos, el microorganismo diseñado por ingeniería para preparar metionina y productos relacionados ha sido diseñado adicionalmente por ingeniería para atenuar la actividad de un péptido codificado por un gen como *metD*, *metK*, *metJ*, *thrB*, *serA* o combinaciones de los mismos. En otros ejemplos, el microorganismo está diseñado adicionalmente por ingeniería para expresar en exceso uno o más genes, como los genes *metA*, *metB*, *metC*, *metE*, *metY*, *metZ*, *metX*, *metH*, *cysPWUA*, *cysD*, *cysN*, *cysC*, *cysH*, *cysl*, *cysJ*, *cysG*, *csyK* y *cysM*.

**[0016]** También se proporcionan procedimientos para preparar metionina y SAME. Estos procedimientos incluyen el cultivo del microorganismo diseñado por ingeniería para preparar metionina y productos relacionados y el aislamiento de los productos. En algunos ejemplos el microorganismo puede ser *E. coli*, *Pseudomonas* sp. o *Corynebacterium glutamicum*.

**[0017]** También se describen en la presente memoria descriptiva nuevas secuencias de ácidos nucleicos y sus secuencias de aminoácidos correspondientes (SEQ ID NO: 1 y 2). Estas secuencias de ácidos nucleicos, así como los fragmentos y variantes de estas secuencias de ácidos nucleicos, son útiles para producir péptidos en microorganismos recombinantes. Los péptidos son útiles, entre otros, para producir metionina y SAME. Los péptidos, las variantes de los mismos y los fragmentos de los mismos, son también útiles para producir agentes de unión específicos como, por ejemplo, anticuerpos.

**[0018]** Se desvela también un procedimiento para mejorar la asimilación de azufre mediante el puenteo del producto intermedio fosfoadenilil-sulfato (PAPS). Este procedimiento puede usarse con cualquier microorganismo usado para producir metionina. El procedimiento se consigue introduciendo en un microorganismo una secuencia de ácidos nucleicos recombinantes que permiten la expresión en exceso de una o más adenilil-sulfato-reductasas (EC 1.8.9.92 o 1.8.4.9). La expresión en exceso puede provenir de la introducción de secuencias de ácidos nucleicos recombinantes que alteran o introducen nuevos elementos de control, como promotores o potenciadores, que causan un aumento en la producción de adenilil-sulfato-reductasa endógena o bien la secuencia de ácidos nucleicos

recombinantes pueden codificar adenilil-sulfato-reductasa.

[0019] Estos y otros aspectos de la descripción son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y los ejemplos ilustrativos.

5

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### [0020]

10 La FIG. 1. es un diagrama que muestra tres vías generales usadas por diversos microorganismos para producir metionina. Todas las vías dependen en parte del uso de aspartato como precursor para la producción de metionina. El aspartato se convierte a través de múltiples etapas en homoserina, la homoserina se convierte en O-acetil-homoserina u O-succinil-homoserina por MetA o MetX. Algunos microorganismos, como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. usan polipéptidos MetA para preparar O-succinil-homoserina mientras otros microorganismos como  
15 *Corynebacterium* y *Leptospira* sp. usan MetX para preparar O-acetil-homoserina. La O-succinil-homoserina y la O-acetil-homoserina pueden convertirse a continuación directamente en homocisteína a través de sulfhidrilación, o bien pueden convertirse en homocisteína a través de transulfuración (las dos reacciones se describen con más detalle en la presente memoria descriptiva). Las enzimas asociadas con la transulfuración se identifican con dos asteriscos (\*\*), y las enzimas asociadas con la sulfhidrilación se identifican con un único asterisco (\*).

20

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la acumulación de metionina en TF4076BJF, con sólo actividad de transulfuración (TF4076BJF), sólo actividad de sulfhidrilación (TF4076BJF-A) o las dos simultáneamente (TF4076BJF metYX(Lm).

25

La FIG. 3 muestra una representación esquemática de la metodología de cribado usada para identificar mutantes de *metA* que son resistentes a la inhibición de retroalimentación. (El producto acumulado en cada caso se muestra en la parte ovalada sombreada).

30

La FIG. 4 muestra el transcurso en el tiempo de la acumulación de metionina producida por una cepa que expresa genes *metA* resistentes a la inhibición de retroalimentación.

La FIG. 5 muestra un modelo de transporte de metionina en *E. coli*.

35

La FIG. 6 muestra la vía de asimilación natural de azufre y una nueva vía alternativa.

## LISTADO DE SECUENCIAS

[0021] Las secuencias nucleicas y de aminoácidos recogidas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando las abreviaturas alfabéticas estándar para bases de nucleótidos y el código de tres letras para los aminoácidos. Se muestra sólo una cadena de cada secuencia de ácidos nucleicos, pero se entiende que la cadena complementaria se incluye mediante cualquier referencia de la cadena presentada.

40

[0022] Las SEQ ID NO: 1-10 muestran secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos correspondientes de varios genes *metA* mutantes derivados de *E. coli*.

45

[0023] Las SEQ ID NO: 11 a 34 muestran diversas primeras secuencias usadas en los Ejemplos.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### 50 Abreviaturas y términos

[0024] Las siguientes explicaciones de términos y procedimientos se proporcionan para describir mejor la presente descripción y para orientar al experto en la materia en la práctica de la presente descripción. Según se usa en la presente memoria descriptiva, "que comprende" significa "que incluye" y las formas en singular "un" o "una" o "el" o "la" incluyen las referencias en plural a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia "que comprende una célula" incluye una o una pluralidad de dichas células, y la referencia "que comprende el péptido de homocisteína-sintasa" incluye la referencia a uno o más péptidos de homocisteína-sintasa y equivalentes de los mismos conocidos para el experto en la materia, y así sucesivamente. El término "o" se refiere a un elemento único de los elementos alternativos enunciados o a una combinación de dos o más elementos, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la frase "actividad de homocisteína-sintasa o actividad de cistationina- $\gamma$ -sintasa" se refiere a actividad de homocisteína-sintasa, actividad de cistationina- $\gamma$ -sintasa o una combinación de actividad de homocisteína-sintasa y actividad de cistationina- $\gamma$ -sintasa.

60

**[0025]** Salvo que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto en la materia al que se dirige esta descripción. Aunque en la práctica o las pruebas de la presente descripción pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria descriptiva, a continuación se describen los procedimientos y materiales adecuados. Los materiales, los procedimientos y los ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Otras características y ventajas de la descripción son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

**[0026] Números de acceso:** Los números de acceso indicados durante esta descripción proceden de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) mantenida por el National Institute of Health, EE.UU. Los números de acceso se indican tal como se proporcionan en la base de datos el 20 de febrero de 2007.

**[0027] Números de Clasificación de Enzimas (EC):** Los números EC proporcionados durante esta descripción proceden de la base de Ligandos KEGG, mantenida por la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics, patrocinada en parte por la Universidad de Tokio. Los números EC se indican tal como se proporcionan en la base de datos el 20 de febrero de 2007.

**[0028] Atenuar:** Reducir el impacto, la actividad o la fuerza de algo. En un ejemplo, la sensibilidad de una enzima en particular para la inhibición de retroalimentación o la inhibición causada por una composición que no es un producto o un reactivo (retroalimentación no específica de la vía) se reduce de manera que en la actividad de la enzima no influye la presencia de un compuesto. Por ejemplo, el gen *metA* y su secuencia de aminoácidos correspondiente (como las secuencias de ejemplo proporcionadas en la SEQ ID NO: 2) muestran varias mutaciones que atenúan su sensibilidad a la inhibición de retroalimentación. La atenuación de la sensibilidad a *MetA* se describe en más detalle en el Ejemplo 3.B. En otro ejemplo, una enzima que es menos activa puede referirse como atenuada.

**[0029] ADNc (ADN complementario):** Un fragmento de ADN que carece de segmentos internos no codificantes (intrones) y secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc puede sintetizarse mediante transcripción inversa a partir de ARN mensajero extraído de células.

**[0030] Deleción:** Eliminación de uno o más nucleótidos de una molécula de ácido nucleico o de uno o más aminoácidos de una proteína, estando unidas conjuntamente las regiones a cada lado.

**[0031] Detectable:** Susceptible de tener una existencia o presencia elucidada. Por ejemplo, la producción de un producto a partir de un reactivo, como la producción de O-succinilhomoserina u homocisteína, es detectable si la señal generada desde el producto o el reactivo es suficientemente intensa para poder medirse.

**[0032] Actividad de sulfhidrilación directa:** capacidad para hacer reaccionar OSHS u OAHS directamente con  $S^{2-}$  para producir homocisteína. Entre los péptidos que tienen esta actividad se incluyen por ejemplo, homocisteína-sintasas (EC 4.2.99.-, EC 2.5.1.49) que están codificadas por genes como *metZ* y *metY*.

**[0033] ADN:** Ácido desoxirribonucleico. El ADN es un polímero de cadena larga que incluye el material genético de la mayoría de los organismos vivos (algunos virus tienen genes que incluyen ácido ribonucleico, ARN). Las unidades de repetición en polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales incluye una de las cuatro bases, adenina, guanina, citosina y timina, unidas a un azúcar desoxirribosa al que se une un grupo fosfato. Los tripletes de nucleótidos, referidos como codones, en moléculas de ADN codifican un aminoácido en un péptido. El término codón se usa también para las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARNm en el que se transcribe la secuencia de ADN.

**[0034] Endógeno:** Según se usa en la presente memoria descriptiva con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula o microorganismo en particular se refiere a un péptido o secuencia de ácidos nucleicos que está en la célula y que no se colocó en la célula usando técnicas de ingeniería recombinante. Por ejemplo, un gen que estaba en la célula cuando la célula se aisló originalmente de la naturaleza. Un gen sigue considerándose endógeno si las secuencias de control, como secuencias promotoras o potenciadoras que activan la transcripción o la traducción, han sido alteradas a través de técnicas recombinantes.

**[0035] Exógeno:** Según se usa en la presente memoria descriptiva con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula en particular se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que no tiene su origen en esa célula en particular tal como se encuentra en la naturaleza. Así, una molécula de ácido nucleico de ocurrencia no natural se considera exógena para una célula una vez introducida en la célula. Una molécula de ácido nucleico que es de ocurrencia natural también puede ser exógena para una célula en particular. Por ejemplo, una secuencia de codificación completa aislada de una célula X es un ácido nucleico exógeno con respecto a la célula Y una vez que la secuencia de codificación se introduce en célula Y, incluso si X e Y son del mismo tipo celular.

- 5 **[0036] Expresión:** El proceso por el cual la información codificada por un gen se convierte en las estructuras y funciones de una célula, como una proteína, ARN de transferencia o ARN ribosómico. Entre los genes expresados se incluyen aquellos que se transcriben en ARNm y a continuación se traducen en proteína y aquellos que se transcriben en ARN pero no se traducen en proteína (por ejemplo, ARN de transferencia y ribosómicos).
- 10 **[0037] Deleción funcional:** Una mutación, deleción parcial o completa, inserción u otra variante realizada en una secuencia de genes que reduce o inhibe la producción del producto génico, o hace que el producto génico sea no funcional. Por ejemplo, la deleción funcional de *metJ* en *E. coli* reduce la represión de la vía biosintética de la metionina. En otro ejemplo, la deleción funcional de *thrB* en *E. coli* reduce el uso de homoserina en la vía biosintética de la treonina. En algunos casos una deleción funcional se describe como una mutación con genes inactivados.
- 15 **[0038] Aislado:** Un componente biológico "aislado" (como una molécula de ácido nucleico, una proteína o una célula) ha sido separado o purificado sustancialmente a partir de otros componentes biológicos en los que el componente se produce de forma natural, como otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, y proteínas. Entre las moléculas de ácidos nucleicos y las proteínas que han sido "aisladas" se incluyen moléculas de ácidos nucleicos y proteínas purificadas por procedimientos de purificación estándar. El término también comprende moléculas de ácidos nucleicos y proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula hospedadora así como moléculas de ácidos nucleicos y proteínas sintetizadas químicamente.
- 20 **[0039]** En un ejemplo, aislado se refiere a una molécula de ácido nucleico de ocurrencia natural que no es inmediatamente contigua con las dos secuencias con las que es inmediatamente contigua (una en el extremo 5' y la otra en el extremo 3') en el genoma de ocurrencia natural del organismo del que procede.
- 25 **[0040] Molécula de ácido nucleico:** Comprende moléculas de ARN y ADN que incluyen, sin limitación, ADNc, ADN genómico y ARNm. Incluye moléculas sintéticas de ácidos nucleicos, como las que se sintetizan químicamente o se producen de forma recombinante. La molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria. Cuando es monocatenaria, la molécula de ácido nucleico puede ser de hebra codificante o de hebra no codificante. Además, la molécula de ácido nucleico puede ser circular o lineal.
- 30 **[0041] Ligada operativamente:** Una primera secuencia de ácidos nucleicos está ligada operativamente con una segunda secuencia de ácidos nucleicos cuando la primera secuencia de ácidos nucleicos está dispuesta en una relación funcional con la segunda secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor está ligado operativamente con una secuencia de codificación si el promotor influye en la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. Generalmente, las secuencias de ADN ligadas operativamente son contiguas y, cuando es necesario se unen a dos regiones de codificación de proteínas, en el mismo marco de lectura. Las configuraciones de genes separados que son transcritos en tándem como un único ARN mensajero se denotan como operones. Así, la colocación de genes en estrecha proximidad, por ejemplo en un vector de plásmido, bajo la regulación transcripcional de un solo promotor, constituye un operón sintético.
- 35 **[0042] ORF (marco de lectura abierto):** Una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican para péptidos, polipéptidos o aminoácidos sin codones de terminación. Estas secuencias normalmente pueden traducirse en un péptido.
- 40 **[0043] Purificado:** El término purificado no requiere una pureza absoluta; al contrario, se entiende como un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de péptidos purificada, como una succinil-CoA-homoserina-aciltransferasa, o una preparación de homocisteína-sintasa, es aquella en la que el péptido está más concentrado que el péptido en su entorno dentro de una célula. Por ejemplo, un péptido purificado es aquel que está sustancialmente separado de componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono y otros péptidos) que pueden acompañarlo. En otro ejemplo, una preparación de péptidos purificada es aquella en la que el péptido está sustancialmente libre de contaminantes, como los que podrían presentarse después de la síntesis química del péptido.
- 45 **[0044]** En un ejemplo, un péptido se purifica cuando al menos aproximadamente el 50% en peso de una muestra está compuesto por el péptido, por ejemplo, cuando al menos aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98% o 99% o más de una muestra está compuesto por el péptido. Entre los ejemplos de procedimientos que pueden usarse para purificar un péptido, se incluyen, pero no se limitan a, los procedimientos desvelados en Sambrook y col. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, Cap. 17). La pureza de las proteínas puede determinarse, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteínas, seguida por la visualización de una única banda de péptidos después de tinción del gel de poliacrilamida; cromatografía líquida a alta presión; secuenciación; u otros procedimientos convencionales.
- 50
- 55
- 60

**[0045] Recombinante:** Una molécula de ácido nucleico o proteína recombinante es aquella que tiene una secuencia que no es de ocurrencia natural, tiene una secuencia que se ha preparado mediante la combinación artificial de dos segmentos de secuencia por lo demás separados, o ambos. Esta combinación artificial puede conseguirse, por ejemplo, mediante síntesis química o por la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácidos nucleicos o proteínas, como técnicas de ingeniería genética. Recombinante se usa también para describir moléculas de ácidos nucleicos que han sido manipuladas artificialmente, pero contienen las mismas secuencias reguladoras y regiones de codificación que se encuentran en el organismo del cual se aisló el ácido nucleico.

**[0046] Identidad/ semejanza de secuencias:** La identidad/ semejanza entre dos o más secuencias de ácidos nucleicos, o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de la identidad o semejanza entre las secuencias. La identidad de secuencia puede medirse en términos de identidad porcentual; cuanto más elevado sea el porcentaje, más idénticas son las secuencias. La semejanza de secuencias puede medirse en términos de semejanza porcentual (que tiene en cuenta sustituciones de aminoácidos conservadoras); cuanto más alto es el porcentaje, más similares son las secuencias. Los homólogos u ortólogos de las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos poseen un grado relativamente alto de identidad/ semejanza de secuencias cuando se alinean usando procedimientos estándar.

**[0047]** Los procedimientos de alineación de secuencias con fines de comparación son bien conocidos en la técnica. Se describen varios programas y algoritmos de alineación en: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gen. 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989; Corpet y col., Nuc. Acids Res. 16:10881-90, 1988; Huang y col. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; y Pearson y col., Meth. Mol. Bio. 24:307-31, 1994. Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990, presenta una consideración detallada de los procedimientos de alineación de secuencias y cálculos de homología.

**[0048]** La NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990) está disponible en varias fuentes, entre ellas el National Center for Biological Information (NCBI, National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894) y en Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Puede encontrarse información adicional en la página web de NCBI.

**[0049]** BLASTN se usa para comparar secuencias de ácidos nucleicos, mientras que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. Para comparar dos secuencias de ácidos nucleicos, las opciones pueden configurarse del modo siguiente: -i se configura como un archivo que contiene la primera secuencia de ácidos nucleicos que se comparará (como C:\seq1.txt); -j se configura como un archivo que contiene la segunda secuencia de ácidos nucleicos que se comparará (como C:\seq2.txt); -p se configura como blastn; -o se configura como cualquier nombre de archivo deseado (como C:\output.txt); -q se configura como -1; -r se configura como 2; y todas las demás opciones se dejan con su valor de configuración por omisión. Por ejemplo, puede usarse la instrucción siguiente para generar un archivo de salida que contenga una comparación entre dos secuencias: C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q -1 -r 2.

**[0050]** Para comparar dos secuencias de aminoácidos, las opciones de B12seq pueden configurarse del modo siguiente: -i se configura como un archivo que contiene la primera secuencia de aminoácidos que se comparará (como C:\seq1.txt); -j se configura como un archivo que contiene la segunda secuencia de aminoácidos que se comparará (como C:\seq2.txt); -p se configura como blastp; -o se configura como nombre de archivo deseado (como C:\output.txt); y todas las demás opciones se dejan con su valor de configuración por omisión. Por ejemplo, puede usarse la instrucción siguiente para generar un archivo de salida que contenga una comparación entre dos secuencias de aminoácidos: C:\B12seq -i c:\seq 1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el archivo de salida designado presentará dichas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el archivo de salida designado no presentará secuencias alineadas.

**[0051]** Una vez alineadas, el número de correspondencias se determina contando el número de posiciones en las que se presenta un resto de nucleótido o aminoácido idéntico en las dos secuencias. El porcentaje de identidad de secuencia se determina dividiendo el número de correspondencias por la longitud de la secuencia presentada en la secuencia identificada, o por una longitud articulada (como 100 nucleótidos o restos de aminoácidos consecutivos de una secuencia presentada en una secuencia identificada), seguido de la multiplicación del valor resultante por 100. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que tiene 1.166 correspondencias cuando se alinea con una secuencia de prueba que tiene 1.554 nucleótidos presenta un porcentaje del 75,0 idéntico a la secuencia de prueba ( $1166 / 1554 * 100 = 75,0$ ). El valor porcentual de identidad de secuencia se redondea a la décima más cercana. Por ejemplo, 75,11, 75,12, 75,13 y 75,14 se redondean hacia abajo a 75,1, mientras que

75,15, 75,16, 75,17, 75,18 y 75,19 se redondean hacia arriba a 75,2. El valor de longitud será siempre un número entero.

5 **[0052]** Con fines de comparación de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30 aminoácidos, se emplea la función Blast de 2 secuencias que usa la matriz BLOSUM62 por omisión para configurar los parámetros por omisión (coste de existencia de hueco de 11, y un coste de hueco por resto de 1). Los homólogos se caracterizan normalmente por posesión de al menos un 70% de identidad de secuencia contado en la alineación de longitud completa con una secuencia de aminoácidos que usa el NCBI Basic Blast 2.0, blastp con huecos con bases de datos como la base de datos nr o swissprot. Las consultas realizadas con el programa blastn se filtran mediante DUST (Hancock y Armstrong, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:67-70). Otros programas usan SEG. Además, puede realizarse una alineación manual. Las proteínas con mayor semejanza todavía mostrarán porcentajes de identidad crecientes cuando se valoran mediante este procedimiento, por ejemplo, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia objeto (es decir secuencia identificada por número de acceso o similar), a la vez que conservan la actividad de la secuencia objeto. En algunos ejemplos, la secuencia objeto tendrá mayor actividad que la de la secuencia natural y en otros ejemplos más será menos activa.

20 **[0053]** Cuando se alinean péptidos cortos (de menos de 30 aminoácidos aproximadamente), la alineación debe realizarse usando la función Blast de 2 secuencias, empleando la matriz PAM30 configurada con los parámetros por omisión (penalizaciones por hueco abierto 9, hueco de extensión 1). Las proteínas con mayor semejanza todavía con la secuencia de referencia mostrarán porcentaje creciente de identidades cuando se valoran con este procedimiento, por ejemplo, al menos el 60%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98%, el 99% de identidad de secuencia. Cuando se está comparando menos que la secuencia completa en cuanto a identidad de secuencia, los homólogos poseerán normalmente una identidad de secuencia de al menos el 75% en las ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de secuencia de al menos el 85%, el 90%, el 95% o el 98% dependiendo de su identidad con la secuencia de referencia. Los procedimientos para determinar la identidad de secuencia en estas ventanas cortas se describen en la página web de NCBI.

30 **[0054]** No obstante, las secuencias de ácidos nucleicos que no muestran un alto grado de identidad pueden codificar secuencias de aminoácidos idénticas o similares (conservadas), debido a la degeneración del código genético. Pueden realizarse cambios en una secuencia de ácidos nucleicos usando esta degeneración para producir múltiples moléculas de ácidos nucleicos que codificarán todas sustancialmente la misma proteína. Dichas secuencias de ácidos nucleicos homólogas pueden, por ejemplo, poseer al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia para una secuencia objeto (secuencias identificadas por número de acceso o similar).

35 **[0055]** Un experto en la materia observará que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan sólo con fines orientativos; es posible que se obtengan homólogos intensamente significativos que se sitúen fuera de los intervalos proporcionados.

40 **[0056] Célula transformada:** Una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una succinil-CoA-homoserina-aciltransferasa, o una molécula de ácido nucleico de homocisteína-sintasa, por ejemplo por técnicas de biología molecular. La transformación comprende todas las técnicas por las cuales puede introducirse una molécula de ácido nucleico en dicha célula, incluyendo, pero sin limitarse a, transfección con vectores víricos, conjugación, transformación con vectores de plásmido e introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección y aceleración por cañones de partículas.

45 **[0057] Actividad de transulfuración:** Una actividad que produce metionina o SAMe por medio del producto intermedio, cistationina. Entre los péptidos que tienen esta actividad se incluyen cistationina- $\gamma$ -sintasa (EC 2.5.1.48) y cistationina- $\beta$ -liasa (EC 4.4.1.8), estos péptidos son codificados por los genes *metB* y *metC*, respectivamente. Puede usarse cualquier combinación de péptidos cistationina- $\gamma$ -sintasa (EC 4.2.99,9) y cistationina- $\beta$ -liasa (EC 4.4.1.8) para permitir que un microorganismo posea actividad de transulfuración.

50 **[0058] En condiciones que permiten la producción del producto:** Cualquier condición de fermentación que permite que un microorganismo produzca un producto deseado, como, por ejemplo, metionina o SAMe. Estas condiciones incluyen normalmente temperatura, aireación y medio. El medio puede ser un caldo o un gel. Generalmente, el medio incluye una fuente de carbono como glucosa, fructosa, celulosa, o similar que puede ser metabolizada por el microorganismo directamente, o pueden usarse enzimas en el medio para facilitar la metabolización de la fuente de carbono. Para determinar si las condiciones de cultivo permiten la producción del producto, el microorganismo puede cultivarse para 24, 36 o 48 horas y puede tomarse una muestra. A continuación pueden someterse a ensayo las células de la muestra en cuanto a la presencia del producto deseado. Por ejemplo cuando se somete a ensayo la presencia de metionina o SAMe pueden usarse los ensayos proporcionados en la



sección de Ejemplos.

**[0059]** **Vector:** Una molécula de ácido nucleico tal como se introduce en una célula, produciendo con ello una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácidos nucleicos que permiten replicación en la célula, como origen de la replicación. Un vector puede incluir también uno o más genes marcadores seleccionables u otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### 10 I. Vías de producción de metionina

**[0060]** Según se muestra en la FIG. 1, pueden usarse muchas vías biosintéticas para producir metionina o sus productos intermedios como fosfato de aspartilo, aspartato-semialdehído-homoserina, O-succinilhomoserina (OSHS), O-acetilhomoserina (OAHS), cistationina, homocisteína, metionina y S-adenosil-metionina (SAME). Para los fines de la presente descripción es posible referirse a un producto intermedio como un reactivo o un producto, dependiendo del contexto. Por ejemplo, cuando se habla de la conversión de aspartato en fosfato de aspartilo que usa una aspartato-cinasa, el aspartato es el reactivo y el fosfato de aspartilo es el producto. Análogamente, cuando la descripción describe la conversión de fosfato de aspartilo en aspartato-semialdehído que usa un aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, el fosfato de aspartilo es el reactivo y el aspartato-semialdehído es el producto. Un experto en la materia observará que la FIG. 1 muestra muchas vías biosintéticas porque dentro de cada clase de enzimas proporcionada hay muchas enzimas que pueden usarse para convertir un reactivo en un producto y, por tanto, definir una vía. Por otra parte, estas reacciones pueden realizarse *in vivo*, *in vitro*, o a través de una combinación de reacciones *in vivo* y reacciones *in vitro*, como, por ejemplo, reacciones *in vitro* que incluyen reacciones químicas no enzimáticas.

**[0061]** También pueden proporcionarse productos intermedios al microorganismo hospedador en la vía incluyendo los productos intermedios en las materias primas de fermentación. Así, si la vía biosintética está produciendo una cantidad inferior a la deseada de un producto intermedio dado, ese producto intermedio puede añadirse a la materia prima. Esto puede realizarse en una instalación de fermentación continua o en una instalación de fermentación por lotes.

**[0062]** Los expertos en la materia reconocerán que un hospedador para la producción puede usar fuentes de carbono distintas de la glucosa. Entre las fuentes alternativas de carbono se incluyen, por ejemplo, sacarosa, fructosa, celulosa, hemicelulosa, almidón o glicerol. Cuando se usan fuentes de carbono alternativas puede ser necesario incluir enzimas que modifiquen la fuente de carbono en los medios de fermentación.

#### A. Glucosa en aspartato

**[0063]** Los microorganismos producen generalmente aspartato a partir de glucosa. Un experto en la materia observará que existen muchos procedimientos para aumentar la concentración de aspartato en cepas de producción. Por ejemplo, aumentando la expresión de las enzimas piruvato-carboxilasa y fosfoenolpiruvato-carboxilasa, alterando la derivación de glioxilato o eliminando el consumo de piruvato en otros productos como acetato o etanol.

**[0064]** Alternativamente, el aspartato puede incluirse en la materia prima de la fermentación, ser consumido por el microorganismo y usarse como reactivo en la vía biosintética de la metionina.

**[0065]** El aspartato sirve también como un producto intermedio en las vías biosintéticas de la lisina, la treonina y la asparagina. Por tanto, puede ser conveniente atenuar o eliminar (inactivar) estas vías, permitiendo así que se use más aspartato en la vía de producción de metionina.

#### B. Aspartato en fosfato de aspartilo

**[0066]** Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir fosfato de aspartilo, o para producir en exceso fosfato de aspartilo. Por ejemplo, la aspartato-cinasa resistente a la retroalimentación descrita en el documento WO-04.069.996-A2 puede usarse para sustituir una aspartato-cinasa endógena o además de una aspartato-cinasa endógena.

**[0067]** Según se usa en la presente memoria descriptiva, aspartato-cinasa incluye péptidos en número de clasificación de enzimas (EC) 2.7.2.4, así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de aspartato en fosfato de aspartilo. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de aspartato-cinasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de aspartato-cinasa aceptarán otros sustratos

además de aspartato. Dichos péptidos de aspartato-cinasa no específicos, por tanto, también se incluyen. Las secuencias de aspartato-cinasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: NZ-AA\_VY01000022, NC\_006958, y NZ\_AAWW01000055, desvelan secuencias de ácidos nucleicos de aspartato-cinasa y los números de acceso GenBank: NP\_418448, NP\_599504 y ZP\_01638096 desvelan secuencias de péptidos de aspartato-cinasa. Los ensayos para caracterizar la actividad de aspartato-cinasa de un péptido en particular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Cohen, GN, Methods in Enzymology, 113:596:600, 1985, para caracterizar la actividad de un péptido específico.

### C. Fosfato de aspartilo en aspartato-semialdehído

**[0068]** Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir aspartato-semialdehído, o para producir en exceso aspartato-semialdehído. Un procedimiento de aumento de la producción de productos en la vía biosintética de la metionina es a través de la expresión en exceso o la expresión de una forma más activa de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa.

**[0069]** Según se usa en la presente memoria descriptiva, aspartato-semialdehído-deshidrogenasa incluye péptidos de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.11), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de fosfato de aspartilo en aspartato-semialdehído. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa catalizarán también otras reacciones. Por ejemplo, algunos péptidos de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa aceptarán otros sustratos además de fosfato de aspartilo, y por tanto, dichos péptidos de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa inespecíficos también se incluyen. Las secuencias de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: NC\_006958, NZ\_AAVY01000015 y NZ\_AAWW01000010 desvelan secuencias de ácidos nucleicos de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa y los números de acceso de GenBank: NP\_417891, NP\_599505 y ZP\_0164))72 desvelan secuencias de péptidos de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa. Los ensayos para caracterizar la actividad de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa de un péptido en particular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Cohen, GN., Methods in Enzymology, 113:600-602 para caracterizar la actividad de un péptido específico.

### D. Aspartato-semialdehído en homoserina

**[0070]** Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir homoserina, o para producir en exceso homoserina. Un procedimiento de aumento de la producción de productos en la vía biosintética de la metionina es a través de la expresión en exceso o la expresión de una forma más activa de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa.

**[0071]** Según se usa en la presente memoria descriptiva, homoserina-deshidrogenasa incluye péptidos de homoserina-deshidrogenasa (EC 1.1.1.3), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de aspartato-semialdehído en homoserina. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de homoserina-deshidrogenasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de homoserina-deshidrogenasa aceptarán otros sustratos además de aspartato-semialdehído. Dichos péptidos de homoserina-deshidrogenasa inespecíficos, por tanto, también se incluyen. Las secuencias de péptidos de homoserina-deshidrogenasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: NC\_006958, NZ\_AAVY01000013 y NZ\_AAWW01000033 desvelan secuencias de ácidos nucleicos de homoserina-deshidrogenasa y los números de acceso de GenBank: NP\_414543, ZP\_01639819 y NP\_600409 desvelan secuencias de péptidos de homoserina-deshidrogenasa. Los ensayos para caracterizar la actividad de homoserina-deshidrogenasa de un péptido en particular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Patte y col., Biochem. Biophys. Acta 128:426-439, 1966, para caracterizar la actividad de un péptido específico.

### E. Homoserina en O-succinil-homoserina (OSHS)

**[0072]** Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir O-succinilhomoserina (OSHS), o para producir en exceso OSHS. Un procedimiento de aumento de la producción de productos en la vía biosintética de la metionina es a través de la expresión en exceso o la expresión de una forma más activa de péptidos de homoserina-O-succiniltransferasa, o usando una forma insensible de inhibición de retroalimentación de péptidos de homoserina-O-succiniltransferasa.

**[0073]** Según se usa en la presente memoria descriptiva, succinil-CoA-homoserina-aciltransferasa, incluye péptidos de homoserina-O-succiniltransferasa (EC 2.3.1.46), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de homoserina en OSHS. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de homoserina-O-succiniltransferasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de succinil-

CoA-homoserina-aciltransferasa aceptarán otros sustratos además de homoserina. Dichos péptidos de succinil-CoA-homoserina-aciltransferasa inespecíficos, por tanto, también se incluyen. Las secuencias de péptidos de homoserina-O-succiniltransferasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, el nº de acceso de GenBank: NZ\_AAWW01000055 desvela una secuencia de ácidos nucleicos de homoserina-O-succiniltransferasa y el nº de acceso de GenBank: AAC76983 desvela una secuencia de péptidos de homoserina-O-succiniltransferasa. Los ensayos para caracterizar la actividad de succinil-CoA-homoserina-aciltransferasa son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Lawrence, J. Bacteriol., 109:8-11, 1972, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos de succinil-CoA-homoserina-aciltransferasa también se refieren en la presente memoria descriptiva como *metA*.

#### F. Homoserina en O-acetilhomoserina (OAHS)

[0074] Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir O-acetilhomoserina (OAHS), o para producir en exceso OAHS. Un procedimiento de aumento de la producción de productos en la vía biosintética de la metionina es a través de la expresión en exceso o la expresión de una forma más activa de péptidos de homoserina-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31).

[0075] Según se usa en la presente memoria descriptiva, homoserina-O-acetiltransferasa, incluye péptidos de homoserina-O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión en OAHS. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de homoserina-O-acetiltransferasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de homoserina-O-acetiltransferasa aceptarán otros sustratos además de homoserina. Dichos péptidos de homoserina-O-acetiltransferasa inespecíficos, por tanto, también se incluyen. Las secuencias de péptidos de homoserina-O-acetiltransferasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: Y10744 REGIÓN: 2822..3961, NZ\_AAAH02000004 REGIÓN: 166057..167193 y NZ\_AAAY02000081 REGIÓN: complemento (11535..12605) desvelan secuencias de ácidos nucleicos de homoserina-O-acetiltransferasa y los números de acceso de GenBank: CAA71733, ZP\_00766367 y ZP\_00107218 desvelan secuencias de péptidos de homoserina-O-acetiltransferasa. Los ensayos para caracterizar la actividad de homoserina-O-acetiltransferasa son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Lawrence, J. Bacteriol., 109: 8-11, 1972, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos de homoserina-O-acetiltransferasa también se refieren en la presente memoria descriptiva como *metX*.

#### G. Sulfhidrilación

[0076] La producción de homocisteína por sulfhidrilación directa se consigue mediante enzimas de homocisteína-sintasa, algunas de estas enzimas usan OSHS como sustrato, y otras usan OAHS como sustrato. Además, algunas de las enzimas pueden usar OSHS u OAHS como sustratos.

##### 1. O-succinilhomoserina (OSHS) en homocisteína

[0077] Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o para producir en exceso homocisteína. Un procedimiento de aumento de la producción de productos en la vía biosintética de la metionina es a través de la expresión en exceso o la expresión de una forma más activa de péptidos de homocisteína-sintasa (EC 4.2.99.-).

[0078] Según se usa en la presente memoria descriptiva, homocisteína-sintasa incluye péptidos de homocisteína-sintasa (EC 4.2.99.-), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de O-succinilhomoserina (OSHS) en homocisteína. La conversión de OSHS en homocisteína a través de reacción con sulfuro se refiere en la presente memoria descriptiva como sulfhidrilación directa. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de homocisteína-sintasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de homocisteína-sintasa aceptarán otros sustratos además de OSHS. Dichos péptidos de homocisteína-sintasa inespecíficos, por tanto, también se incluyen. Las secuencias de péptidos de homocisteína-sintasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, el nº de acceso de GenBank: AE004091 desvela secuencias de ácidos nucleicos de homocisteína-sintasa (O-succinil-L-homoserina-sulfhidrilasa) y el nº de acceso de GenBank: AAG06495 desvela secuencia de aminoácidos de homocisteína-sintasa (O-succinil-L-homoserina-sulfhidrilasa). Los ensayos para caracterizar la actividad de homocisteína-sintasa de un péptido en particular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Yamagata, Methods in Enzymology, 143:478, 1987, con el sustrato apropiado, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos de homocisteína-sintasa también se refieren en la presente memoria descriptiva como *metZ*.

## 2. O-acetilhomoserina (OAHS) en homocisteína

[0079] Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o para producir en exceso homocisteína. Un procedimiento de aumento de la producción de productos en la vía biosintética de la metionina es a través de la expresión en exceso o la expresión de una forma más activa de péptidos de homocisteína-sintasa (EC 2.5.1.49).

[0080] Según se usa en la presente memoria descriptiva, homocisteína-sintasa incluye péptidos de homocisteína-sintasa (EC 2.5.1.49), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de O-succinilhomoserina (OAHS) en homocisteína. La conversión de OAHS en homocisteína a través de reacción con sulfuro se refiere en la presente memoria descriptiva como sulfhidrilación directa. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de homocisteína-sintasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de homocisteína-sintasa aceptarán otros sustratos además de OSHS, por ejemplo la homocisteína-sintasa descrita en el Ejemplo 2, más adelante, acepta OAHS u OSHS como sustrato, dichos péptidos de homocisteína-sintasa inespecíficos, por tanto, también se incluyen. Las secuencias de péptidos de homocisteína-sintasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: AE004091 REGIÓN: 5655648..5656925, Y10744 REGIÓN: 1485..2813, NZ\_AAAH02000004 REGIÓN: 164536..165990 y NZ\_AAAY02000081 REGIÓN: complemento (12750..14054) desvelan secuencias de ácidos nucleicos de homocisteína-sintasa (O-acetil-L-homoserina-sulfhidrilasa) y los números de acceso de GenBank: AAG08410, CAA71732, ZP\_00766366 y ZP\_00107219 desvelan secuencias de aminoácidos de homocisteína-sintasa (O-acetil-L-homoserina-sulfhidrilasa). Los ensayos para caracterizar la actividad de homocisteína-sintasa de un péptido en particular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Yamagata, *Methods in Enzymology*, 143:478, 1987, con el sustrato apropiado, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos de homocisteína-sintasa también se refieren en la presente memoria descriptiva como *metY*.

## H. Transulfuración

### 1. O-succinilhomoserina (OSHS) o acetilhomoserina (OAHS) en cistationina

[0081] Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir cistationina, o para producir en exceso cistationina. Un procedimiento de aumento de la producción de productos en la vía biosintética de la metionina es a través de la expresión en exceso o la expresión de una forma más activa de péptidos de cistationina- $\gamma$ -sintasa (EC 2.5.1.48).

[0082] Según se usa en la presente memoria descriptiva, cistationina- $\gamma$ -sintasa incluye péptidos de cistationina- $\gamma$ -sintasa (EC 2.5.1.48), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de OSHS u OAHS en cistationina. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de cistationina- $\gamma$ -sintasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de cistationina- $\gamma$ -sintasa aceptarán otros sustratos además de OSHS u OAHS. Dichos péptidos de cistationina- $\gamma$ -sintasa inespecíficos, por tanto, también se incluyen. Las secuencias de péptidos de cistationina- $\gamma$ -sintasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: NC\_006958, NZ\_AAWW01000006 y NC\_004129 desvelan secuencias de ácidos nucleicos de cistationina- $\gamma$ -sintasa y los números de acceso de GenBank: NP\_418374, YP\_348978 y NP\_601979 desvelan secuencias de péptidos de cistationina- $\gamma$ -sintasa. Los ensayos para caracterizar la actividad de cistationina- $\gamma$ -sintasa de un péptido en particular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito en *Methods in Enzymology*, 17:425-433, 1971, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos de cistationina- $\gamma$ -sintasa también se refieren en la presente memoria descriptiva como *metB*.

### 2. Cistationina en Homocisteína

[0083] Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o para producir en exceso homocisteína. Un procedimiento de aumento de la producción de productos en la vía biosintética de la metionina es a través de la expresión en exceso o la expresión de una forma más activa de péptidos de cistationina- $\beta$ -liasa (EC 4.4.1.8).

[0084] Según se usa en la presente memoria descriptiva, cistationina- $\beta$ -liasa incluye péptidos de cistationina- $\beta$ -liasa (EC 4.4.1.8), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de cistationina en homocisteína. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de cistationina- $\beta$ -liasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de cistationina- $\beta$ -liasa aceptarán otros sustratos además de cistationina. Dichos péptidos de cistationina- $\beta$ -liasa inespecíficos, por tanto, también se incluyen. Las secuencias de péptidos de cistationina- $\beta$ -liasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank:

NZ\_AAWW01000001, NC\_006958 y NZ\_AAVY01000004 desvelan secuencias de ácidos nucleicos de cistationina- $\beta$ -liasa y los números de acceso de GenBank: NP\_746463, YP\_226552 y NP\_417481 desvelan secuencias de péptidos de cistationina- $\beta$ -liasa. Los ensayos para caracterizar la actividad de cistationina- $\beta$ -liasa de un péptido en particular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito en *Methods in Enzymology*, 143:483-486, 1987, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos de cistationina- $\beta$ -liasa también se refieren en la presente memoria descriptiva como *metC*.

### I. Homocisteína en Metionina

10 **[0085]** Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir metionina, o para producir en exceso metionina. Un procedimiento de aumento de la producción de productos, como metionina o SAME en la vía biosintética de la metionina es a través de la expresión en exceso o la expresión de una forma más activa de péptidos de homocisteína-metilasa (EC 2.1.1.14 y 2.1.1.13).

15 **[0086]** Según se usa en la presente memoria descriptiva, homocisteína-metilasa incluye péptidos de homocisteína-metilasa (EC 2.1.1.14 y 2.1.1.13), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de homocisteína en metionina. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de homocisteína-metilasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de homocisteína-metilasa aceptarán otros sustratos además de homocisteína. Dichos péptidos de homocisteína-metilasa inespecíficos, por tanto, también se incluyen. Las secuencias de péptidos de homocisteína-metilasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: NC\_004129, NC\_006958 y NC\_000913 desvelan secuencias de ácidos nucleicos de homocisteína-metilasa y los números de acceso de GenBank: AP\_004520, YP\_225791 y CAK16133 desvelan secuencias de péptidos de homocisteína-metilasa. Los ensayos para caracterizar homocisteína-metilasa actividad de un péptido en particular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito en *Analytical Biochemistry*, 228, 323-329, 1995, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos de homocisteína-metilasa también se refieren en la presente memoria descriptiva como *meth* o *metE*.

### J. Metionina en S-adenosilmetionina

30 **[0087]** Los hospedadores de producción pueden ser diseñados por ingeniería usando polipéptidos conocidos para producir S-adenosilmetionina (SAME), o para producir en exceso SAME. Un procedimiento de aumento de la producción de productos, en la vía biosintética de la metionina es a través de la expresión en exceso o la expresión de una forma más activa de péptidos de metionina-adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6). Un experto en la materia observará que en casos en los que la metionina es el producto deseado, la actividad o expresión de péptidos de metionina-adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6) codificado por *metK*, puede estar atenuada.

40 **[0088]** Según se usa en la presente memoria descriptiva, metionina-adenosiltransferasa incluye péptidos de metionina-adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de metionina en SAME. Además, un experto en la materia observará que algunos péptidos de metionina-adenosiltransferasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de metionina-adenosiltransferasa aceptarán otros sustratos además de metionina. Dichos péptidos de metionina-adenosiltransferasa inespecíficos, por tanto, también se incluyen. Las secuencias de péptidos de metionina-adenosiltransferasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: NC\_002516, NC\_006958 y NC\_000913 desvelan secuencias de ácidos nucleicos de metionina-adenosiltransferasa y los números de acceso de GenBank: NP\_747070, CAI37180 y NP\_600817 desvelan secuencias de péptidos de metionina-adenosiltransferasa. Los ensayos para caracterizar la actividad de metionina-adenosiltransferasa de un péptido en particular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito en *Methods in Enzymology*, 94: 219-222, 1983, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos de metionina-adenosiltransferasa también se refieren en la presente memoria descriptiva como *metK*.

## II. Ingeniería genética de cepa de producción para aumentar la producción de metionina

55 **[0089]** La producción de aspartato puede aumentarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, la producción de aspartato puede aumentarse incrementando la cantidad de oxaloacetato producido por las células con varios enfoques diferentes. (Gokarn y col., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:188-95, 2001; Sanchez y col., *Metabolic Eng.*, 8:209-226, 2006).

60 **[0090]** La producción de producto puede aumentarse también mediante la expresión en exceso de varios genes en la Vía biosintética de la L-metionina. Por ejemplo, genes como *metA*, *metB*, *metC*, *metE*, y *metH*, *cysD*, *cysN*, *cysC*, *cysH*, *cysI*, *cysJ*, *cysK* y *cysM* puede situarse bajo el control de una diversidad de promotores permitiendo así que se produzcan cantidades superiores de estas enzimas.

- 5 **[0091]** El gen *metA* codifica homoserina-succiniltransferasa que es la primera enzima en la vía de biosíntesis de la metionina a partir de homoserina y un punto de regulación para producción de metionina. La proteína *metA* es una proteína sensible a la temperatura de 186 restos de aminoácidos con una masa molecular calculada de 35,7 kDa. Se conoce que la actividad *metA* es inhibida por los productos finales, metionina y S-adenosilmetionina (Lee y col., J. Biol. Chem. 241:5479-5780, 1966). La inhibición de retroalimentación por estos dos productos es sinérgica, lo que significa que bajas concentraciones de cada metabolito en solitario son sólo ligeramente inhibitorias, mientras que en combinación se ejerce una inhibición intensa. Así, una cepa de producción podría beneficiarse de una inhibición de actividad de MetA resistente a la retroalimentación.
- 10 **[0092]** Otro gen que puede ser atenuado o eliminado en la cepa de producción de metionina es *metJ*. El péptido codificado por *metJ* regula la expresión de varios genes implicados en la vía de biosíntesis de la metionina. La proteína codificada por *metJ* se une a S-adenosil-metionina y reprime los genes *metA*, *metC* y *metF*.
- 15 **[0093]** La proteína codificada por el gen *metF*, 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa, está implicada en la síntesis de N(5)-metiltetrahidrofolato que es un donador de grupos metilo para la producción de L-metionina a partir de homocisteína (Sheppard y col., J. Bacteriol. 181:718-25, 1999). El documento US-2002/0.049.305 desvela que la producción de L-metionina puede mejorarse aumentando la expresión de 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa (*metF*) en *Corynebacteria*. En consecuencia, los microorganismos diseñados por ingeniería descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser diseñados también por ingeniería para aumentar la producción de *metF*.
- 20 **[0094]** La modulación del gen *metK* también puede aumentar la producción de metionina y SAME. S-adenosilmetionina (SAME) es el donador de grupos metilo primario en todos los organismos y participa en la biosíntesis de la poliamina. SAME también es conocida como metionina-adenosiltransferasa (MAT o MetK, EC 2.5.1.6). MetK cataliza la única ruta conocida para biosíntesis de SAME. La cadena completa de tripolifosfato se escinde de ATP y se forma el compuesto de sulfonio.
- 25 **[0095]** La formación de SAME reduce la concentración de metionina y reduce la actividad de la vía biosintética de la metionina por medio de inhibición de retroalimentación de MetA. Por ello, la delección o atenuación funcional *metK* puede aumentar la producción de metionina.
- 30 **[0096]** Un experto en la materia observará que la eficacia de uso de azufre por cualquier célula que está fabricando metionina es importante. Esto se aplica especialmente para microorganismos que usan fosfoadenilil sulfato (PAPS) como un producto intermedio durante la asimilación de azufre, porque la preparación de PAPS requiere el gasto de una molécula de ATP.
- 35 **[0097]** El sulfato es bastante poco reactivo y primero debe convertirse en una forma más reactiva con el fin de que la célula pueda usarlo. En *E. coli* el sulfato se incorpora en la célula mediante un sistema de transporte periplásmico, compuesto por tres componentes de membrana citoplásmica y una proteína de unión específica del sustrato situada en el espacio periplásmico. Los tres componentes de membrana de la sulfato-permeasa son codificados por los genes *cysT*, *cysW* y *cysA* (locus *cysA*). Los productos del locus *cysA* son regulados en concierto con el resto de la vía de asimilación de sulfato como parte del regulón *cys*. A continuación se activa el sulfato por acoplamiento con un nucleósido para preparar fosfosulfatos de nucleósido de alta energía por medio de una vía que parece similar en la mayoría de los organismos.
- 40 **[0098]** Según se muestra en la FIG. 6, un microorganismo como *E. coli* usa una vía que convierte sulfato en adenilil sulfato (APS) que usa un péptido de sulfato-adenililtransferasa (EC 2.7.7.4 codificada por *cysNcysD*). A continuación la APS se convierte en PAPS mediante APS cinasa (EC 2.7.1.25 codificada por *cysC*). Esta etapa requiere que una ATP. PAPS se convierte en sulfito mediante una PAPS reductasa (EC 1.8.4.8 codificada por *cysH*) y que el sulfito se reduzca a sulfuro mediante NADPH-sulfito-reductasa (EC 1.8.1.2 codificada por *cysIcysJcysG*). La vía alternativa, mostrada en el lado derecho de la FIG. 6, convierte APS directamente en sulfito usando una adenil-sulfato-reductasa (EC 1.8.9.92 o 1.8.4.9). Un experto en la materia observará que cualquier adenilil-sulfato-reductasa que puede convertir APS en sulfito funcionará. Por ejemplo, la adenilil-sulfato-reductasa de *Bacillus subtilis* (Número de acceso CAA04409), o de *Pseudomonas aeruginosa* (Número de acceso NP\_250447).
- 45 **[0099]** La adenilil-sulfato-reductasa que codifica secuencias de ácidos nucleicos puede introducirse en cualquier microorganismo usado para producir metionina. Por ejemplo, las cepas descritas en la presente memoria descriptiva, así como las cepas descritas en los documentos WO-2005/108.561 y WO-2006/138.689 de Metabolic Explorer, y los descritos por Kumar y Gomes, Biotechnology Advances 23: 41-61, 2005, pueden beneficiarse de la ruta desvelada que sortea la PAPS y requiere así una molécula de ATP menos para la asimilación de sulfato.
- 50 **[0099]**
- 55
- 60

## EJEMPLOS

**Ejemplo 1. Múltiples vías de producción de metionina, una de las cuales usa sulfhidrilación directa, usando secuencias de ácidos nucleicos expresadas exógenamente.**

**A. Construcción de un microorganismo que tiene metABC (transulfuración) y metAZ (sulfhidrilación directa)**

**[0100]** Tal como se describe anteriormente, la producción de metionina endógena en *E. coli* tiene lugar principalmente a través de la reacción de transulfuración. Este Ejemplo describe la ingeniería de *E. coli* para aumentar la sulfhidrilación directa mientras se mantiene también la vía de *metABC* endógena.

**[0101]** La sulfhidrilación directa se incrementó por clonación de O-succinilsulfhidrilasa (EC 4.2.99.-) que convierte O-succinilhomoserina en homocisteína por reacción con sulfuro de hidrógeno. Esta enzima es codificada por *metZ* y puede encontrarse en algunas especies de *Pseudomonas* (Vermeij y Kertesz, J Bacteriol. 181:5833-5837, 1999 e Inoue y col., J. Bacteriol. 179:3956-3962, 1997).

**[0102]** Más específicamente, se clonó *metZ* a partir de *Pseudomonas aeruginosa* en auxótrofos de metionina de la cepa TF4076BJF, que se obtuvo de la cepa productora de treonina TF4076 (modificada adicionalmente por la delección de *thrB* y *metJ*, y la inserción de *metF* bajo el control del promotor pTrc, descrita adicionalmente en el Ejemplo 3, más adelante). Estos auxótrofos tienen delección de los genes *metB* o *metB* y *metC*. El *metZ* de *Pseudomonas aeruginosa* impulsó el crecimiento de los mutantes de delección de *metB* y el *metBC* en medio mínimo. Aun cuando en cultivos en matraz la producción de metionina no se recuperó totalmente, la expresión de *metZ* induce la producción de metionina hasta ~100 mg/l en mutante de delección *metBC*, según se muestra en la Tabla 1. Esto indica que *metZ* es responsable de la producción de homocisteína en la célula.

**[0103]** La baja producción de metionina de los mutantes de delección transformados con *metZ* puede deberse a la limitación de sulfuro en la fracción intracelular (más adelante se proporcionan procedimientos para aumentar la concentración de sulfuro). Esto se sustenta en el hallazgo de que el crecimiento de la cepa de delección *metBC* transformada con *metZ* se potenció en medios M9 en presencia de sulfuro de sodio 2 mM. En ensayos *in vitro*, la O-succinilsulfhidrilasa tenía una baja afinidad por el sulfuro. A través de la evolución directa, es posible desarrollar O-succinilsulfhidrilasas mejoradas con afinidad por el sulfuro superior y también mayor actividad. Una O-succinilsulfhidrilasa muy activa podría sustituir *metB* y *metC* en la vía de la metionina, o podría complementar la vía para aumentar el flujo de carbono en metionina.

**Tabla 1**

Complementación de crecimiento y producción de metionina en TF4076BFJ-ABC						
TF4076BJF-ΔABC	DO	glucosa usada (g/l)	producto intermedio met (mg/l)		GA y HS (g/l)	
			OSH	met	HS	GA
vector vacío	2,5	10,0	3.867	0,0	0,0	0,4
pCL- <i>metB</i>	20,9	38,1	0,0	0,0	0,6	0,2
pCL- <i>metB-metC</i>	9,7	40,0	0,0	670	4,36	2,4
pPro- <i>metZ</i>	13,0	40,0	0,0	101	3,1	4,3

pCL-*metB*: *metB* con su propio promotor en pCL1920  
 pCL-*metB-metC*: *metB* y *metC* con sus propios promotores en pCL1920  
 pPro-Z: *metZ* a partir de *Pseudomonas aeruginosa* en vector pProLar (ClonTech)

**B. Construcción de un microorganismo que tiene metABC (transulfuración) y metXY (sulfhidrilación directa)**

**[0104]** Este ejemplo muestra la producción simultánea de metionina a partir de dos vías en *E. coli*. Una vía es la vía de *metABC* endógena y la segunda vía permite la sulfhidrilación directa por medio de la expresión de *metY* y *metX* a partir de varios organismos.

**[0105]** Tal como se muestra en la FIG. 1 *E. coli* produce metionina de forma endógena que usa los genes de la vía de transulfuración *metA*, *metB* y *metC* y avanza a través de OSHS. Se usó ingeniería genética para añadir una vía adicional a *E. coli* mediante clonación y expresión de los genes *metX* y *metY* en *E. coli*, que dio como resultado un organismo hospedador que fabrica metionina a través de transulfuración y sulfhidrilación directa simultáneamente.

5 **[0106]** Los genes *metY* y *metX* usados para construir la vía heteróloga se clonaron a partir de ADN de *Leptospira meyeri*, *Deinococcus radiodurans*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Brevibacterium linens*, *Nostoc punctiforme* y *Pseudomonas aeruginosa* según se describe más adelante, y se construyeron varias cepas diferentes para analizar el impacto de la adición de estos genes en la producción de metionina. La homocisteína-sintasa de *Corynebacterium glutamicum* y *Saccharomyces cerevisiae* también se clonó y se sometió a ensayo. Se demostró que las dos vías funcionan simultáneamente y con esta adición se mejoró la producción de metionina.

10 **[0107]** Para evaluar si las enzimas *metX* y *metY* de *I. meyeri* podrían complementar el crecimiento de un auxótrofo de metionina de *E. coli*, se amplificó el grupo de genes *metYX* de *I. meyeri* a partir del plásmido *metXY*-pCR2,0-TOPO y se clonó en el vector pPRO-Nde-del. La transcripción de los genes *metYX* en este plásmido se inició mediante un promotor *lacIara* situado en el vector.

15 **[0108]** Se evaluaron cuatro cepas de *E. coli* que incluían W3110  $\Delta$ *metA* (detención de producción de OSHS), TF4076BJF (producción de homoserina incrementada), TF4076BJF  $\Delta$ *metA* (detención de producción de OSHS) y TF4076BJF  $\Delta$ *metAmetB* (detención de producción de OSHS y cistationina a partir de OAHS u OSHS). La cepa TF4076BJF es un auxótrofo de treonina, desregulado para la producción de metionina con un aumento del flujo de carbono hasta homoserina, que es capaz de producir metionina a través de la vía de *E. coli* natural.

20 **[0109]** Las cepas se transformaron con el vector de clonación y el plásmido que contiene *metYX*, respectivamente. A continuación se distribuyeron los transformantes en placas de medio mínimo M9 que contenían glucosa (2 g/l), isoleucina (0,15 g/l), treonina (0,3 g/l), kanamicina (50 mg/l) e IPTG. El grupo de genes *metYX* de *Leptospira meyeri* complementó el crecimiento de W3110  $\Delta$ *metA* en 24 h. La cepa W3110 $\Delta$ *metA* que expresa sólo *metX* no fue capaz de crecer en la placa mínima M9. Por tanto, *E. coli* W3110 carece de una enzima eficiente para usar la O-acetil-L-homoserina como precursor para la biosíntesis de metionina. La cepa W3110 $\Delta$ *metA* transformada con el vector vacío de control, pPRO-Nde-del, según se describe en el documento WO-2006/113.897, no creció en 25 48 h. La cepa TF4076BJF creció en las placas de medio mínimo cuando se transformó con el vector de clonación o el plásmido que contenía *metYX* de *I. meyeri*.

30 **[0110]** También se sometieron a ensayo los genes *metYX* alternativos en cuanto a complementación de crecimiento en medio mínimo. En la clonación de los genes *metYX* de *D. radiodurans*, *C. aurantiacus*, *B. linens*, *N. punctiforme*, la traducción del gen *metX* se acoplo con la traducción del gen *metY* iniciado por un rbs situado en el vector, debido a la ausencia de un sitio de unión ribosómico (rbs) de *E. coli* eficaz adyacente al gen en la dirección 3', *metX*.

35 **[0111]** El grupo de genes *metYX* de *I. meyeri*, *D. radiodurans* y *C. aurantiacus* fue el más eficaz en la complementación del crecimiento de las cepas auxótrofas de metionina. La complementación de crecimiento se observó también en un auxótrofo de metionina en el que *metY* (*I. meyeri*) se sustituyó por *metY* (*P. aeruginosa*) en el grupo de genes *metYX* de *I. meyeri*. Estas células mostraron una tasa de crecimiento reducida con respecto al mismo auxótrofo de metionina que expresaba el *metYX* de *I. meyeri*.

40 **[0112]** La producción de metionina se determinó usando el protocolo de matraz de agitación descrito en el Ejemplo 3. Brevemente, los cultivos se desarrollaron a 30°C durante 50 horas en el medio suplementado con 150 mg/l de metionina (para mejorar el crecimiento inicial) y la metionina se midió con HPLC. La Tabla 2 muestra que la producción de metionina fue superior en las cepas que llevaban las dos vías en comparación con cuando sólo se disponía de la transulfurilación o la sulfhidrilación directa.

Tabla 2

Producción de metionina			
Cepa	DO	Glucosa usada	Metionina producida (final - inicial)
		g/l	mg/l
TF4076BJF	8,2	40,0	439
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm)	10,2	36,5	984
TF4076BJF <i>metY</i> (Pa) <i>metX</i> (Lm)	9,2	29,1	299
TF4076BJF <i>metYX</i> (Dr)	8,8	40,0	510
TF4076BJF <i>metYX</i> (Ca)	12,1	40,0	740
TF4076BJF $\Delta$ <i>metA metYX</i> (Lm)	5,8	23,6	368
TF4076BJF $\Delta$ <i>metA metY</i> (Pa) <i>metX</i> (Lm)	6,6	21,1	79
TF4076BJF $\Delta$ <i>metAB metYX</i> (Lm)	6,2	23,7	280
TF4076BJF $\Delta$ <i>met4B metXY</i> (Dr)	6,6	32,6	140



**[0113]** Los genes *metA*, y *metB* son necesarios para la síntesis de metionina en cepas de *E. coli*. Cuando ninguno de los genes está inactivado, *E. coli* pierde la capacidad de producción de metionina *de novo*. Los datos anteriores indican que la adición del operón *metYX* restaura la producción de metionina a niveles similares a los obtenidos con un protótrofo de metionina. La producción de metionina fue en algunos casos más del doble cuando se disponía de las dos vías para la célula. Estos resultados muestran que las vías no son mutuamente excluyentes y que la homoserina se convierte en metionina por medio de las dos rutas.

**[0114]** Para mostrar adicionalmente los beneficios de la vía doble, las cepas se compararon en vasos de fermentación de 5 litros usando el protocolo de fermentación descrito en el Ejemplo 3. La acumulación de metionina comenzó después de aproximadamente 24 horas y continuó hasta que se detuvo el suministro. La enzima codificada por el gen *metY* de la mayoría de los organismos es inhibida por retroalimentación mediante altas concentraciones de metionina. En algunos casos, la enzima codificada por el gen *metX* también es inhibida por retroalimentación. En consecuencia, se observó una acumulación significativa de homoserina y OAHS en estas fermentaciones. En la FIG. 2 se muestra una comparación de producción de metionina en fermentadores y los datos se resumen en la Tabla 3. Estos resultados confirmaron la observación observada en los matraces, de que la producción de metionina podría potenciarse de forma significativa mediante la expresión adecuada de una vía de sulfhidrilación directa heteróloga, y que esta vía podría ser responsable de la mayoría de la producción de metionina si las enzimas se expresaran adecuadamente.

Tabla 3

Expresión heteróloga de la vía de sulfhidrilación directa		
Cepa	Acumulación de metionina g/l	Acumulación de O-acetilhomoserina (g/l)
TF4076BJF	2,1	----
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm)	4,7	7,7
TF4076BJF <i>metY</i> (Pa) <i>metX</i> (Lm)	1,5	20,0
TF4076BJF <i>metYX</i> (Dr)	4,7	32,4
TF4076BJF <i>metYX</i> (Ca)	4,9	20,7
TF4076BJF $\Delta$ <i>metA metYX</i> (Lm)	4,1	6,2

**[0115]** Para aumentar el flujo de productos a metionina, pueden usarse *metY* y a *metX* que resistentes a la inhibición de retroalimentación. También es posible regular el nivel de expresión de *metX* y la expresión de *metH* para impulsar más rápidamente la conversión de homoserina a metionina.

**[0116]** Las diferencias en la producción de metionina indican que la vía de *metXY* es altamente eficaz en *E. coli* y que la vía de *metXY* añadida a una cepa desregulada como esta puede dar como resultado más del doble de acumulación de metionina.

### Ejemplo 2. Homocisteína-sintasa que usa O-acetil-L-homoserina (OAHS) u O-succinil-L-homoserina (OSHS)

**[0117]** Este ejemplo describe procedimientos usados para aislar una homocisteína-sintasa codificada por *metY* a partir de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 47085). Esta enzima es inhibida por la L-metionina y por la S-adenosil-L-metionina. La actividad enzimática se analizó de acuerdo con Yamagata, Methods in Enzymology, 143:478, 1987. El procedimiento fue modificado ligeramente en el sentido de que se tomaron múltiples puntos de muestras, se usó guanidina para inactivar la reacción y la formación de homocisteína se detectó usando DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) Sigma D8130) como en el análisis para *metA* descrito en el Ejemplo 3.B. Una unidad enzimática (U) se definió como la formación de un mmol de homocisteína por minuto a temperatura ambiente.

**[0118]** Se expresó y se analizó MetY de *P. aeruginosa* usando 17,5 pg de proteína purificada (marcada en N). A diferencia de *metY* de *I. meyeri* y de la mayoría de las demás homocisteína-sintasas publicadas, esta enzima estaba activa con acetil y succinil-homoserina. La actividad fue similar para los dos sustratos, fue inhibida por retroalimentación por la metionina y la SAME y el nivel de inhibición de retroalimentación parecía ser ligeramente inferior cuando el sustrato era OSHS. Se observó cierta inhibición a metionina 1 mM. Con OAHS como sustrato, para 10, 50 y 100 mM la enzima conservó aproximadamente el 50%, el 19% y el 9%, respectivamente, de la actividad que tenía en ausencia de metionina. La actividad en presencia de 5 y 10 mM SAME fue de aproximadamente el 72% y el 21% de la actividad original. Cuando el sustrato era OSHS la actividad descendió al 53% y el 31% en presencia de metionina 50 y 100 mM y al 86% y el 19% en presencia de SAME 5 y 10 mM.

### Ejemplo 3. Procedimientos de tinciones de hospedadores por ingeniería genética para aumentar la producción de metionina

**[0119]** Además de añadir vías biosintéticas de metionina a organismos hospedadores según se describe anteriormente en el Ejemplo 1, el organismo hospedador puede estar además diseñado por ingeniería genética para reducir la inhibición de la vía biosintética de la metionina, aumentar la disponibilidad de reactivo y/o reducir el catabolismo del producto.

#### A. Inactivación de represor global de metionina y treonina-cinasa junto con expresión potenciada de 5,10-metilen-tetrahidrofolato-reductasa para aumentar la producción de metionina.

**[0120]** Un procedimiento de preparación de una cepa de producción de metionina consiste en modificar una cepa que ya ha sido diseñada por ingeniería para producir un aminoácido, como la treonina. Por ejemplo, puede usarse la cepa de producción de treonina TF 4076, descrita en la Publicación de patente coreana nº 92-8365 (KFCC 10.718), aun cuando es un auxótrofo de metionina). Entre las cepas adicionales de ejemplo se incluyen las depositadas en ATCC (13070, 13071, 21148, 21149, 21150, 21151, 21272, 21277, 21278, 21318, 21319, 21320) que se describen como productores en exceso de metionina.

**[0121]** Usando la cepa TF 4076 como punto de partida, la producción de metionina se potenció por delección del gen *thrB* para evitar la producción de treonina y por delección del gen *metJ* para aumentar la represión de la expresión de la vía biosintética de la metionina. La cepa se modificó también para expresar en exceso el gen *metF*.

##### Delección de *thrB*

**[0122]** *thrB* se eliminó usando una casete de loxP-cloranfenicol (loxP-Cm) (Gen 2000 vol. 247, p255-264). El gen *thrB* fue clonado mediante PCR usando secuencias de cebador 1 y 2 (SEQ ID NO: 5 y 6) que usan el cromosoma de *E. coli* K 12 como plantilla. Se usaron condiciones de PCR de 94°C durante 30 segundos; a continuación 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos; y 72°C durante 7 minutos, con premezcla de PCR HL (Bioneer Co, Corea). Se eluyeron con gel los productos de PCR y se clonaron en el kit de clonación pCR2,1-topo (Invitrogen, EE.UU.) y se denominaron pCR-*thrB*. pCR-*thrB* se digirieron usando pflMI y se insertó la casete loxP-Cm. A partir de este plásmido, se amplificó por PCR el gen *thrB* que contenía la casete loxP-Cm usando cebadores 1 y 2 (SEQ ID NO: 11 y 12). Se purificaron por gel los productos de PCR. Se sometieron los fragmentos de PCR a electroporación en la cepa TF4076 y se seleccionaron colonias resistentes al cloranfenicol y se confirmó para delección de *thrB*. Se eliminó el marcador de cloranfenicol de una colonia identificada y la cepa final obtenida se llamó TF4076B. Esta cepa no creció en medio mínimo M9 (DIFCO) sin treonina, lo que indicaba que esta cepa es un auxótrofo de treonina.

1. *thrB* SEQ ID NO: 11

5'- GCT AGC c atg gtt aaa gtt tat gcc ccg - 3'

2. *thrB* SEQ ID NO: 12

5'- GAG CTC tta gtt ttc cag tac tcg tgc gc - 3'

##### Delección de *metJ*

**[0123]** Para eliminar el gen *metJ* represor global de metionina, se usó el procedimiento de delección FRT de una etapa (Datsenko y Wanner PNAS 97:6640-6645, 2000). Se amplificaron los fragmentos de PCR usando secuencias de cebador 3, 4 (SEQ ID NO: 13 y 14) y pKD3 de plantilla (véase Datsenko y Wanner, PNAS 97:6640-6645, 2000). Las condiciones de PCR usadas fueron 94°C durante 30 segundos; seguido por 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; a continuación 72°C durante 7 minutos, con premezcla de PCR HL (Bioneer Co., Corea). Se seleccionaron colonias resistentes al cloranfenicol y la delección del gen *metJ* se confirmó usando las secuencias de cebador de PCR 5 y 6 (SEQ ID NO: 15 y 16). Usando transformación del plásmido pCP20, se eliminó el gen marcador de cloranfenicol y se confirmó la eliminación usando PCR. La cepa obtenida se llamó TF4076BJ.

3. *metJ* + cloranfenicol SEQ ID NO: 13

5'-atggctgaat ggagcggcga atatcagc ccatcagctg agcacggcaa ggtgtaggct ggagctgctt c-3'

4. *metJ*+ cloranfenicol SEQ ID NO: 14

5'-gtattccac gtctccgggt taatcccat ctacgcatg atctccat gaatacctc ctag-3'

5. *metJ* SEQ ID NO: 15

5'-gggctttgct ggtgaaatg-3'

6. *metJ* SEQ ID NO: 16

5'-actttgcat gagcgagag-3'

*Integración de metF*

**[0124]** Para complementar la auxotrofia de la metionina de TF4076BJ, se expresó el gen *metF* en la cepa TF4076BJ. Se amplificó el gen *metF* usando secuencias de cebador 7 y 8 (SEQ ID NO: 17 y 18) y el cromosoma de la cepa K12 de *E. coli* como plantilla. Se usaron condiciones de PCR de 94°C 30 segundos, a continuación 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, y a continuación 72°C 7 minutos y premezcla de PCR HL (Bioneer Co., Corea). Se eluyeron con gel los fragmentos de PCR y se insertaron en los sitios *NheI* y *SacI* en el vector pSE380 (Invitrogen Co.). El plásmido se llamó pSE380-*metF*. pSE380-*metF* se transformó en la cepa TF4076BJ. El transformante creció en medio mínimo M9 (Difco) que contenía treonina e isoleucina lo que indicaba la complementación de la auxotrofia de la metionina.

**[0125]** Se determinó el nivel de expresión del gen *metF* bajo el control de dos promotores diferentes. Los promotores fueron el promotor pCJ1 (PCT/KR2005/004338) y el promotor pThreonine. Se amplificó el gen *metF* usando secuencias de cebador 9 y 10 (SEQ ID NO: 19 y 20) y el cromosoma de la cepa K12 de *Escherichia coli* como plantilla. Se usaron condiciones de PCR de 94°C 30 segundos, a continuación 25 ciclos de 94°C 30 seg, 55°C 30 seg, 72°C 1 min, y a continuación 72°C 7 min y premezcla de PCR HL (Bioneer Co., Corea). Se eluyeron con gel los fragmentos de PCR y se ligaron en los sitios *PvuII* y *HindIII* en el vector pCL1920 (Lerner e Inouye, Nucleic acids Research 18:4631, 1990) que contiene el promotor pCJ1 o el promotor pThreonine. Se amplificó el promotor pCJ1 por PCR usando secuencias de cebador 11 y 12 (SEQ ID NO: 21 y 22) y se amplificó el promotor pThreonine a partir del cromosoma de K12 de *E. coli* usando secuencias de cebador 13 y 14 (SEQ ID NO: 23 y 24). Se eluyeron con gel los fragmentos de PCR y se integraron en los sitios *KpnI* y *EcoRV* en el vector pCL1920. Las condiciones usadas fueron las mismas que anteriormente. El plásmido que contenía el gen *metF* bajo el control del promotor pCJ1 se llamó pCL-pCJ1-*metF* y el plásmido que contenía el gen *metF* bajo el control del promotor pThreonine se llamó pCL-pThr-*metF*. Cada plásmido se transformó en la cepa TF4076BJ y se midió la producción de metionina.

**[0126]** Se usó un protocolo de cultivo en matraz de agitación para someter a ensayo las cepas del modo siguiente: se incubó un cultivo de siembra a 31°C durante 6 h en medio consistente en (en 1 l): 10 g de extracto de levadura, 6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,5 g de NaCl, 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g de glucosa, 0,49 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,015 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, A continuación se usó para inocular matraces con el medio siguiente: (1 l): 17 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g de MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2 g de extracto de levadura, 0,3 g de L-treonina, 10 mg de MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg de ZnSO<sub>4</sub>, 30 g de CaCO<sub>3</sub>, 40 g de glucosa y 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2. Los matraces se incubaron durante 64 a 72 horas a 31°C con agitación a 250 rpm. Después de la centrifugación, se aisló el sobrenadante del cultivo y se usó para análisis de metionina.

**[0127]** Para el cultivo de células que contenían el plásmido pSE380-*metF*, se añadieron 100 µg/l de ampicilina e IPTG 0,5 mM al medio. El gen *metF* bajo el control del promotor pCJ1 produjo la mayor parte de la metionina según se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Producción de metionina en células que contiene varias casetes de expresión de <i>metF</i>			
	DO	glucosa usada (g/l)	Metionina (mg/l)
TF4076BJ	7,8	34	0
TF4076BJ/pSE380- <i>metF</i>	5,4	29	130
TF4076BJ/pCL-pCJ1- <i>MetF</i>	7,4	35	206
TF4076BJ/pCL-pthr- <i>MetF</i>	22	40	136

**[0128]** Para expresar el gen *metF* de forma más estable, se integraron los genes *metF* bajo los promotores pTrc, pCJ1 y pThreonine en el locus *lacZ* del cromosoma TF4076BJ. Cada gen *metF* se amplificó por PCR a partir de cada plásmido y se introdujo en el sitio *NsiI* en el vector pBrint (Borgne y col., Gen 223:213-219, 1998). Los vectores se transformaron en la cepa TF4076BJ y se seleccionó un transformante que creció en medios que contenían cloranfenicol a 37°C y se confirmó para integración del gen *metF* en el locus *LacZ* del cromosoma. Se transformaron colonias seleccionadas por pJW168 y se eliminó el marcador de cloranfenicol. Las células que contenían el gen pCJ1-*metF* no pudieron obtenerse y el transformante que contenía la casete pThr-*metF* no creció bien. Sólo crecieron bien las células que contenían pTrc-*metF* gen en el locus *LacZ*. El cultivo en matraz de esta cepa mostró ~600 mg/l de producción de metionina en presencia de IPTG 0,5 mM en los medios. La cepa final que contenía gen pTrc-*metF* se llamó TF4076BJF y se analizó posteriormente.

**[0129]** En resumen, la cepa TF4076BJF se obtuvo de la cepa productora de treonina TF 4076, que fue modificada por la delección de *thrB* y *metJ*, y la inserción de *metF* bajo el control del promotor pTrc. La Tabla 5 muestra la producción de homoserina y metionina por TF4076BJF.

Tabla 5

Producción de metionina de la cepa TF4076BJF				
Cepa	DO	Glucosa usada (g/l)	Producción de homoserina (g/l)	Producción de metionina (g/l)
TF4076BJ	15,3	24,7	0,62	0
TF4076BJF	10,6	34,7	4,2	0,64

7. metF SEQ ID NO: 17

5 5'- GCT AGC c atgagcttttttcacgccag - 3'

8. metF SEQ ID NO: 18

5'- GAG CTC ttataaaccaggtcgaaccc - 3'

9. metF SEQ ID NO: 19

5'- CAGCTGatgagcttttttcacgccag- 3'

10 10. metF SEQ ID NO: 20

5'- AAGCTT ttataaaccaggtcgaaccc- 3'

11. promotor CJ1 SEQ ID NO: 21

5'- cgg ggt acc acc gcg ggc tta ttc cat tac at- 3'

12. promotor CJ1 SEQ ID NO: 22

15 5'- acg cga tat ctt aat ctc cta gat tgg gtt tc- 3'

13. promotor de treonina SEQ ID NO: 23

5'- cgg ggt acc tgg tta caa caa cgc ctg g- 3'

14. promotor de treonina SEQ ID NO: 24

5'- cat gat atc tac ctgc tta cc ttt ggt cg- 3'

20

**[0130]** Se cultivó la cepa TF4076BJF en fermentadores de 5 l según el protocolo descrito más adelante, y se obtuvo una producción de aproximadamente 2,2 g/l de metionina en 96 h.

**[0131]** Se realizaron fermentaciones de 5 l usando el siguiente protocolo. Para comparar el efecto de los diferentes genes clonados en la cepa de *E. coli*, se usó un protocolo de fermentación básico para recipientes de 5 litros. Se cultivó el inóculo en 25 ml de medio consistente en 10,0 g de extracto de levadura, 4,49 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 g de NaCl, 3,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,49 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,015 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 2 g/l de glucosa en un volumen de 1 l. Se usaron 50 mg/l del antibiótico apropiado dependiendo de la resistencia de la cepa sometida a ensayo. Después de la incubación con agitación a 31°C y 250 rpm durante 8 a 24 horas, se transfirió el cultivo a 200 ml del mismo medio y se incubó en las mismas condiciones durante 16 a 20 horas. Se usó este cultivo para inocular fermentadores con 2,5 l de medio.

25

30

**[0132]** El medio de fermentación consistía en: 17,0 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0 g/l de extracto de levadura, 2,0 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g/l de L-treonina, 0,3 g/l de isoleucina, 0,01 g/l de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,01 g/l de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 g/l de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,0 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 mg/l de piridoxal, 2 mg/l de vitamina B12 y 40 g/l de glucosa. Se añadieron antibióticos e IPTG dependiendo de la cepa cultivada. La temperatura de fermentación se mantuvo a 31°C, el oxígeno disuelto por encima del 30% de saturación y el pH se controló inicialmente con NH<sub>4</sub>OH al 28%. Después de que se agotara la glucosa, el pH se elevaría. En ese punto, se iniciaría una alimentación fija continua, o se añadirían partes alícuotas de 100 a 150 ml, basándose en aumentos en el pH. El suministro consistía en 4,0 g/l de extracto de levadura, 33 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,0 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 g/l de L-treonina, 1,0 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 mg/l de vitamina B12 y 400 g/l de glucosa. Se introdujeron algunas variaciones menores en el medio y el suministro dependiendo de la cepa. La fermentación continuó durante un total de 72 a 96 horas. En este periodo se midió la concentración de metionina, así como el crecimiento celular mediante densidad óptica y uso de glucosa.

35

40

#### 45 **B. Generación de homoserina-succiniltransferasas resistentes a la retroalimentación para la producción de metionina**

**[0133]** Se construyó una cepa de *E. coli* con los genes *metA* y *metB* eliminados. Esta cepa mostró acumulación de homoserina debido a la pérdida de actividad MetA. Cuando se expresó la casete de *metA* no manipulada genéticamente en esta cepa, se produjo OSHS por la actividad de MetA en ausencia de metionina. Sin embargo, cuando se añadió metionina en los medios, la cepa con casete *metA* natural acumuló de nuevo homoserina debido a la inhibición de retroalimentación de la actividad MetA. Así, los genes resistentes a la retroalimentación pueden identificarse mediante ensayos de acumulación de O-succinil-homoserina en presencia de metionina. El mutante que produjo más OSHS en presencia de una alta cantidad de metionina en los medios contiene el *metA* más resistente a la inhibición de retroalimentación.

50

55

**[0134]** En la FIG. 3 se proporciona una representación esquemática de la metodología de cribado.

*Construcción de mutante de delección de metB*

**[0135]** Para preparar un mutante de delección de *metB* en TF4076BJF, se usó el procedimiento de delección de una etapa FRT (Datsenko y Wanner, PNAS 97:6640-6645, 2000). Se amplificaron los fragmentos de PCR usando secuencias de cebador 15 y 16 (SEQ ID NO: 25 y 26) y se sometió a electroporación la plantilla pKD3 en células TF4073BJF. Se usaron las condiciones de PCR de 94°C 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, a continuación 72°C 7 min y premezcla de PCR HL (Corea, Bioneer Co). Se seleccionaron colonias resistentes al cloranfenicol y se confirmó la delección del gen *metB* usando PCR. Se eliminó el gen marcador de cloranfenicol usando transformación de plásmido pCP20, y la eliminación se confirmó mediante PCR. La cepa obtenida por este procedimiento se llamó TF4076BJF-B.

10 15. *metB* + cloranfenicol SEQ ID NO: 25  
5'-TTACTCTGGT GCCTGACATT TCACCGACA  
AAGCCAGGG AACTTCATCA Cgtgtaggct ggagctgctt c -3'  
16. *metB* + cloranfenicol SEQ ID NO: 26  
5'-TTACCCCTTG TTTGCAGCCC GGAAGCCATT  
15 TTCCAGGTCG GCAATTAAT Tcatatgaat atcctcctta g -3'

#### Construcción de mutante de delección de *metA*

20 **[0136]** Para preparar un mutante de delección de *metA* en TF4076BJF-B, se usó el procedimiento de delección de una etapa FRT (PNAS. 97: 6640-6645, 2000). Se amplificaron los fragmentos de PCR usando secuencias de cebador 17, 18 (SEQ ID NO: 27 y 28) y se sometió a electroporación la plantilla pKD3 en células TF4073BJF-B. Se usaron las condiciones de PCR de 94°C 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, a continuación 72°C 7 minutos y premezcla de PCR HL (Corea, Bioneer Co). Se seleccionaron colonias resistentes al cloranfenicol y se confirmó la delección del gen *metA* usando PCR. Se eliminó el gen marcador de cloranfenicol usando transformación de plásmido pCP20, y la eliminación se confirmó mediante PCR. La cepa obtenida por este procedimiento se llamó TF4076BJF-BA.

17. *metA* + cloranfenicol SEQ ID NO: 27

5'-  
**CAATTTCTTGCGTGAAGAAAACGTCTTTGTGATGACAACCTT**  
**CTCGTGCGTgtgtaggctggagctgcttcc -3'**

30

18. *metA* + cloranfenicol SEQ ID NO: 28

5'-  
**AATCCAGCGTTGGATTCATGTGCCGTAGATCGTATGGCGTG**  
**ATCTGGTAGcatatgaatcctccttag-3'**

35

#### Construcción de vector de expresión de *metA*

**[0137]** Para preparar una biblioteca de *metA*, se construyó un vector de expresión de *metA*. Se amplificó el gen *metA* usando secuencias de cebador 19 y 20 (SEQ ID NO: 29 y 30) con el cromosoma de la cepa K12 de *E. coli* como plantilla. Se usaron las condiciones de PCR de 94°C 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, a continuación 72°C 7 minutos y premezcla de PCR HL (Corea, Bioneer Co). Se eluyeron con gel los fragmentos de PCR y se ligaron en pCL1920 en el sitio *Sma*I. El plásmido se llamó pA-CL. Se transformó el plásmido pA-CL en la cepa TF4076BJFAB y se realizó cultivo en matraz con y sin metionina. Se midieron OSHS y homoserina mediante el mismo procedimiento que se describe anteriormente para la metionina. Según se muestra en la Tabla 6, las células que contenían el plásmido pA-CL en ausencia de metionina produjeron 3,8 g/l OSHS con 0,24 g/l de homoserina. Sin embargo, en presencia de 1 g/l de metionina las células produjeron 5,8 g/l OSHS con 4,9 g/l de homoserina. El aumento de la cantidad de OSHS se debe al aumento del crecimiento por adición de metionina, mientras que el aumento de homoserina se debe a la inhibición de realimentación de la actividad de *metA* por la metionina.

50

Tabla 6

Producción de O-succinil-homoserina y de homoserina en cepa TF4076BJF-AB que contenía plásmido pA-CL					
Adición de metionina	Cepa	DO	Glucosa usada (g/l)	Producción de OSH (g/l)	Producción de HS (g/l)
0 g/l	TF4076BJF-AB/pC11920	2,2	14,2	0	1,42
0 g/l	TF4076BJF-AB/pA-CL	2,1	13,1	3,8	0,24
1 g/l	TF4076BJF-AB/pC11920	4,7	39,8	0	5,7
1 g/l	TF4076BJF-AB/pA-CL	6,4	37,4	5,9	4,9

19: *metA* SEQ ID NO: 29

5 5'-aatggatccTGCCGTGAGCGGCGAATAC-3'

20: *metA* SEQ ID NO: 30

5'-agctctagaCTGCTGAGGTACGTTTCGG-3'

Construcción de biblioteca de mutantes de pA-CL

10

[0138] Para preparar una biblioteca de mutantes de pA-CL, se realizó PCR propensa a errores. La PCR propensa a errores se realizó usando las secuencias de cebador 21 y 22 (SEQ ID NO: 31 y 32) con el plásmido pA-CL como plantilla. Se usaron las condiciones de PCR de 94°C 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 68°C 2 minutos, a continuación 72°C durante 7 minutos y kit de mutagenia de PCR de diversificación BD (BD, EE.UU.). Los fragmentos de PCR se digirieron mediante *Bam*HI y *Xba*I y se ligaron en pCL1920. Se transformó la biblioteca en la cepa TF4076BJF-AB y se recogieron ~30.000 transformantes para análisis posterior.

15

21: pCL1920 SEQ ID NO: 31

5'-CGAAGTAATCGCAACATCCG-3'

20

22: pCL1920 SEQ ID NO: 32

5'-GTCTGCTATGTGGTGCTATC-3'

Preparación de extracto en crudo de enzima *MetB*

25

[0139] Para medir la OSHS mediante procedimiento enzimático, se usó la enzima *MetB* de *E. coli*. La enzima *MetB* reacciona con OSHS y cisteína en una proporción 1:1 y produce cistationina. El reactivo DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) Sigma D8130) reacciona con el grupo SH libre de cisteína y forma un color amarillo que puede medirse a 415 nm. Antes de la reacción de *MetB*, la cisteína reacciona con DTNB y se vuelve de color amarillo. Después de la reacción de *MetB*, la cisteína se convierte en cistationina que no puede unirse a DTNB. Al reducirse la DO a 415 nm después de la reacción, puede medirse la cantidad de OSHS en la mezcla de reacción.

30

[0140] Para la expresión en exceso de enzima *MetB*, el gen *metB* amplificado por PCR del cromosoma K12 de *E. coli* fue digerido por *Bam*HI y *Hind*III y se clonó en el vector pCDF-Duet (Novagene, EE.UU.). Se realizó una reacción de PCR usando las secuencias de cebador 23 y 24 (SEQ ID NO: 33 y 34) y el cromosoma K12 de *E. coli* como plantilla. Se usaron las condiciones de PCR de 94°C 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, a continuación 72°C 7 minutos y premezcla HL (Bioneer, Corea). El plásmido que contenía el gen *metB* se transformó en *E. coli* usando una célula de Tuner (Novagen, EE.UU.) y se cultivó el transformante durante toda la noche con medio LB que contenían 50 µg/ml de espectinomicina. Se diluyó durante toda la noche el caldo de cultivo en medio LB que contenía 50 µg/ml de espectinomicina y se incubó a 37°C hasta que se alcanzó una DO a 600 nm de 0,6, momento en el cual se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,2 mM y se incubó el cultivo durante 4 h a 30°C. Se recogieron las células por centrifugación a 12.000 rpm, se resuspendieron en tampón de fosfato de potasio 0,1 M (pH 7,5) y se fragmentaron por sonicación (5 x 30 segundos). Se adquirió el extracto de células en crudo por centrifugación durante 20 min a 12.000 rpm y a continuación se usó el sobrenadante para ensayo enzimático.

35

40

45

23: *metB* SEQ ID NO: 33

5'-gccaggatccgATGACGCGTAAACAGGCCAC-3'

24: *metB* SEQ ID NO: 34

5'-ccgcaagcttTTACCCCTTGTTCAGCC-3'

50

Cribado de *metA* resistente a retroalimentación

[0141] Se identificaron mutaciones de *metA* resistentes a retroalimentación mediante inoculación de la cepa TF4076BJF-AB que contenía mutantes pA-CL en placas de 96 pocillos que contenían medio de microfermentación y

se cultivaron durante 48 h a 31°C con agitación. El medio de microfermentación es 1 volumen de medio de matraz de agitación según se describe en el Ejemplo 3 y 1 volumen de tampón de fosfato de potasio 0,05 M de pH 6,5, con 5 g/l de L-metionina.

5 **[0142]** A continuación se centrifugaron las placas de 96 pocillos durante 10 min a 3.000 rpm y se midió OSHS en el sobrenadante por el procedimiento enzimático descrito anteriormente (Preparación de extracto en crudo de MetB). Se mezclaron 50 µl del sobrenadante del cultivo con 50 µl de tampón de reacción (Tampón de reacción: tampón de fosfato de potasio 0,1 M (pH 7,5)+ cisteína 2,5 mM + 1/500 PLP 10 mM (5'-fosfato de piridoxal hidratado, Sigma P9255) + 1/100 extracto en crudo de MetB (5 mg/ml)). Se incubó la reacción durante 10 minutos a 37°C. Se  
10 añadieron 100 µl de DTNB (4 mg/10 ml de tampón de fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,5) y se tomó la DO a 415 nm. De cada placa de 96 pocillos se seleccionaron 1 o 2 colonias que mostraban la menor absorbancia a 415 nm y se estriaron en medio LB que contenía 50 µg/ml de espectinomicina. Se inocularon las colonias resultantes en otra placa de 96 pocillos que contenía medio de microfermentación y se realizó una segunda tanda de cribado. A  
15 continuación se sometieron a ensayo las cepas seleccionadas en las condiciones de cultivo de matraz de agitación descritas anteriormente, con la adición de 5 g/l de metionina al medio, y se midió la producción de O-succinil-homoserina.

**[0143]** Se seleccionaron 24 mutantes de 12.000 colonias para cultivo en matraz y se seleccionaron 14 mutantes para secuenciación. De ellos, se identificaron 5 mutantes nuevos. Los otros 9 mutantes restantes poseían las mismas mutaciones que se han comunicado anteriormente. En la Tabla 7 se muestra la acumulación de O-SHS y homoserina en cultivo en matraz de agitación para los 14 mutantes, y en la Tabla 8 se muestran los cambios de aminoácidos en las secuencias de *metA* de los mutantes seleccionados.  
20

Tabla 7

25

Rendimiento en matraz de agitación de mutantes seleccionados				
Nº de cepa	DO	Glucosa usada (g/l)	Producción de OSH (g/l)	Producción de HS (g/l)
Control (TF4076BJF-AB/pA-CI)	6,0	40	4,9	5,5
#7	4,9	40	9,2	2,9
#8	4,6	40	5,4	3,8
#10	4,7	40	8,8	3,0
#11	4,7	40	9,1	2,8
#32	5,8	40	10,7	1,6
#34	5,6	40	10,1	2,4
#36	5,6	40	10,4	2,2
#37	5,9	40	9,6	1,6
#39	7,0	40	9,2	1,0
#22	4,8	40	9,4	1,4
#23	4,6	40	9,6	1,4
#41	5,6	40	11,8	2,1
#43	6,1	40	11,2	2,3
#47	6,0	40	11,2	2,2
#49	5,6	40	11,5	2,1

Tabla 8

Análisis de secuencias de mutantes seleccionados						
posición	natural	32 SEQ ID NO: 2	37 SEQ ID NO: 4	10 SEQ ID NO: 6	11 SEQ ID NO: 8	41 SEQ ID NO: 10
24	T		S (A70T)			
29	S				P (T85C)	
79	N					S (A236G)
114	E				G (A341G)	
140	F				S (T419C)	I (T418A)
163	K	Q (A487C)				
222	F	I (T666A)				
275	A		E (C824A)			
290	N			H (A868C)		
291	Y					N (T871A)
295	Q	R (A884G)				
297	T		A (A889G)			
304	M					I (A910T)
305	N		Y (A913T)			
sin cambio en aminoácidos		A105G, A597T	C222T	T450C	T915C	T573C

#### Resistencia de retroalimentación de mutante *metA*

5 [0144] Dado que todas las *metA* resistentes a la inhibición de realimentación produjeron cantidades similares de OSHS en presencia de 5 g/l metionina en el cultivo en matraz, se añadieron concentraciones superiores de metionina en el medio de cultivo en matraz y se determinó la producción de OSHS. Después de 64 h de cultivo con 30 g/l de L-metionina, la producción de OSHS se redujo sólo en la muestra del mutante #37, y todas las demás mostraron niveles similares de producción de OSHS que en presencia de 5 g/l de metionina. Estos resultados, presentados en la Tabla 9, indicaban que los *metA* de resistencia a la inhibición de realimentación eran resistentes a concentraciones de hasta 30 g/l de metionina.

Tabla 9

Producción de OSHS de mutantes <i>metA</i> en presencia de 30 g/l de metionina				
Cepa	DO	Glucosa usada (g/l)	Producción de OSH (g/l)	Producción de HS (g/l)
Control (TF4076BJF-AB/pA-CI)	4,36	38,6	2,7	1,1
# 10	3,3	33,1	10,6	0,44
# 11	3,5	36,6	11,5	0,22
# 32	3,1	30,2	10,7	0,23
# 37	2,0	22,0	6,2	0,05
# 41	4,4	40,0	10,5	No analizado

#### Caracterización *in vitro* de proteínas de *metA* mutantes

20 [0145] Se usó PCR para amplificar y a continuación clonar los cinco genes mutantes de *metA* identificados como pCL-A#10, pCL-A#11, pCLA#32, pCL-A#37 y pCL-A#41, en el vector pET30a. Todas las construcciones se sometieron a análisis de secuencias de ADN para confirmar la presencia de mutaciones. Los genes se clonaron con etiqueta His en el extremo C para purificación enzimática. Se expresaron en exceso y se purificaron las enzimas y se midió la actividad en presencia de diferentes niveles de metionina y SAME, según describe Lawrence, *J. Bacteriol.*, 109:8-11, 1972. Las únicas modificaciones en el ensayo fueron que se tomaron puntos múltiples y que la reacción se inactivó con guanidina. La Tabla 10 proporciona un resumen de la actividad de los diversos mutantes, y muestra claramente que todos los mutantes eran resistentes a la inhibición de realimentación en comparación con la enzima de tipo natural y que los mutantes #10 y #11 fueron los más resistentes a inhibición de metionina y SAM.



Tabla 10

Caracterización de mutante y enzimas MetA de tipo natural						
Actividad específica (U/mg)*	natural	#10 SEQ ID NO: 6	#11 SEQ ID NO: 8	#32 SEQ ID NO: 2	#37 SEQ ID NO: 4	#41 SEQ ID NO: 10
control	386	176	479	276	228	315
c/ Met 100 mM	29	172	451	218	190	232
c/ Met 300 mM	-	125	282	-	-	-
c/ SAM 10 mM	11	150	395	78	63	108
% de retención de actividad específica	natural	#10	#11	#32	#37	#41
control	100	100	100	100	100	100
% de retención de actividad específica	natural	#10	#11	#32	#37	#41
c/ Met 100 mM	7,6	97	94	79	83	74
c/ Met 300 mM	-	70	56	-	-	-
c/ SAM 10 mM	2,9	85	82	28	27	34

\*En las que U es la formación de 1 mmol de CoA por minuto a temperatura ambiente

- 5 [0146] Se seleccionaron los mutantes *metA#10* y *metA#11* (SEQ ID NO: 5 y 7, respectivamente) para análisis posterior. Se analizaron los mutantes de *metA #10* y *#11* en cuanto a su ausencia de inhibición en un experimento que usaba 300 mM de metionina. Este valor es próximo a la máxima concentración que puede alcanzarse en las condiciones de ensayo. La solubilidad de metionina en agua es de 5,6 g/100 ml a 30°C, que corresponde a una concentración de 375 mM. En presencia de 300 mM de metionina, el mutante *metA#10* conservó el 70% de su actividad específica, y el mutante *metA #11* conservó el 55% de su actividad específica. Así, los mutantes *metA#10* y *#11* pueden usarse en un microorganismo de producción de metionina.

*Producción de metionina con metA resistente a la inhibición de retroalimentación*

- 15 [0147] Se clonaron *metA#10* y *metA#11* individualmente en la cepa de producción de metionina TF4076BJF. *MetA#10* también se clonó junto con *metYX* de *I. meyeri*. Los clones se sometieron a ensayo después del protocolo de fermentación descrito en el Ejemplo 3A. Se valoraron las concentraciones de metionina después de 78 horas de fermentación y los resultados se muestran en la Tabla 11. No hubo acumulación de O-succinil-homoserina en ninguna de las fermentaciones. En la FIG. 4 se muestran los cursos de tiempo de la producción de metionina.

Tabla 11

Acumulación de metionina	
Cepa	Valor cuantitativo final de metionina (g/l)
TF4076BJF	2,1
TF4076BJF <i>metA#10</i>	6,3
TF4076BJF <i>metA#11</i>	4,5
TF4076BJF <i>metA#10</i> + <i>metYX</i> (Lm)	6,6

- 25 [0148] Estos resultados muestran que la expresión de *metA* resistentes a la inhibición de retroalimentación aumentó producción de metionina y que la combinación de una vía de sulfhidrilación directa y un *metABC* resistente a la inhibición de retroalimentación vía mostraron menos sinergia que la observada con *MetA* natural. La menor sinergia observada indica que la acumulación de metionina puede por inhibición de *MetY*. Para aumentar adicionalmente la producción de metionina, puede usarse *MetY* resistente a la inhibición de retroalimentación.

30 C. Estrategias para atenuación de actividad de *MetK* en *E. coli*

- [0149] Según se describe anteriormente, la formación de SAME disminuye la concentración de metionina y reduce la actividad de la vía biosintética de la metionina por medio de inhibición de retroalimentación de *metA*.

- 35 [0150] El aislamiento de mutantes en el gen *metK* se facilita por la observación de que algunos mutantes resistentes a la metionina han reducido los niveles de *metK* y producen metionina en exceso. La Tabla 12 recoge varias mutaciones de *metK* que se han descrito como causantes de una disminución en la actividad de *MetK*. Estos mutantes se construyen según se describe más adelante.

5 **[0151]** El gen *metK* de *E. coli* (Número de acceso AP\_003499 o BAE77005) fue clonado y se expresó en exceso con una etiqueta His en el extremo N o en el extremo C en el vector pET28b. Se realizó mutagenia dirigida al sitio usando el clon *metK* con etiqueta His en el extremo C para generar los mutantes deseados. Se confirmó la expresión de las proteínas de MetK mutante.

10 **[0152]** Los mutantes MetK se purificaron (usando la etiqueta His en el extremo C) y se sometieron a ensayo *in vitro*. Como control se usó la proteína MetK con etiqueta His en el extremo C natural. Se sometieron a ensayo los mutantes usando un ensayo radiactivo. Las condiciones de ensayo fueron las siguientes:

Mezcla de ensayo:

15 1,0 ml HEPES/KOH 0,5 M, pH 8,0  
 0,5 ml KCl 1,0 M  
 0,2 ml MgCl<sub>2</sub> 1,0 M  
 1,0 ml ATP 100 mM (sal disódica, pH 8,0 con KOH)  
 0,1 ml metionina 50 mM  
 0,1 ml NEN [metil-<sup>14</sup>C]metionina 6,6 ml H<sub>2</sub>O  
 25 mM EDTA pH 8,0 detención de ensayos.

20 **[0153]** Se añadieron 45 µl de mezcla de ensayo a un tubo Eppendorf y 5 µl de enzima (datos normalizados mostrados en la Tabla 13). Se incubó la reacción a temperatura ambiente (o 25°C) durante un periodo deseado (1 a 10 minutos). Se interrumpió la reacción con la adición de 150 µl de EDTA 25 mM. Se recogieron 100 µl de la reacción en un círculo de filtro de fosfoquelulosa Whatman P-81 de 2,5 cm de diámetro (marcado en lápiz). Se lavaron los filtros con 3 l de agua destilada, se secaron al aire y se colocaron en viales de centelleo con acuasol. Se contaron las emisiones usando una ventana que se extiende desde <sup>14</sup>C a aproximadamente 0. Se determinaron los niveles de eficacia e inactivación del ensayo añadiendo una cantidad conocida de recuentos de <sup>14</sup>C-SAM puro y procesamiento a través de todo el procedimiento. Los valores de base son normalmente < 100 cpm (recuentos totales 10<sup>5</sup> cpm aproximadamente por reacción).

30

Tabla 12

Actividad normalizada					
Resto	Posición	Sustitución	Efecto esperado en sint. SAME	Referencia	Actividad (CPM SAME/ $\mu$ g proteína purificada/min) **
His	14	Asn	Actividad reducida $\sim 10^4$ veces	J. Biol Chem 2000	7,7
Asp	16	Asn	reducción kcat de $\sim 10^3$ veces	J. Biol Chem 1999	2,5
Gly	77	Val	Reducción esperada en actividad MetK	Comunicación personal Markham	6,9
Cys	90	Ala	Sólo 10% de actividad natural	J. Biol Chem 1995	Igual que natural
Cys	90	Ser	Sólo 10% de actividad natural	J. Biol Chem 1995	23,2
Asp	118	Asn	reducción kcat de $\sim 10^3$ veces	J. Biol Chem 1999	1,3
Val	185	Glu	6,4X aumento en Met excretado con respecto al control	AEM 2005	4,9
Asp	238	Asn	reducción kcat de $\sim 10^3$ veces	J. Biol Chem 1999	1,9
Cys	239/2 40	Ala*	Sólo 10% de actividad natural	J. Biol Chem 1995	Igual que natural
Lys	245	Met	42.000 veces menor actividad que la natural	J. Biol Chem 2000	2,5
Asp	271	Ala	reducción kcat de $\sim 10^3$ veces	J. Biol Chem 1999	0,4 (no duplicado)
control natural *		Ninguna		Cargill BioTDC	995,4
natural	Sin marcar	Ninguna	lab	Markham lab	5600

\* La proteína MetK de control natural también se marcó con etiqueta His en el extremo C para comparación con las proteínas *metK* mutantes marcadas. Se observó una disminución de aproximadamente 6 veces en la actividad con la proteína MetK natural marcada en comparación con la actividad de proteína MetK no marcada.  
\*\* - actividad durante tiempo de reacción de 5 minutos comunicada

5 **[0154]** El producto de la reacción de MetK, SAME, es un inhibidor no competitivo de MetK. Por tanto, el análisis de las cinéticas de reacción se complica y se espera que la diferencia entre las actividades del tipo natural y de los mutantes sea todavía mayor. Si se comprende la actividad de las diversas enzimas MetK mutantes puede diseñarse un hospedador adecuado para la producción.

#### 10 **D. Regulador del transportador de SAME**

15 **[0155]** S-AdenosilMet (SAME) sirve como donador primario de grupos metilo en todos los organismos, está implicado en la biosíntesis de poliamina y es esencial para el crecimiento celular. S-adenosiltransferasa (MetK, EC 2.5.1.6) cataliza la única ruta conocida para la biosíntesis de SAME en *E. coli*, ya que este organismo no puede captar SAME del medio de crecimiento. Una alternativa a la regulación por disminución de *metK* según se describe anteriormente consiste en proporcionar *E. coli* con la capacidad de captación de SAME y simultáneamente de inactivación del gen *metK*, para reducir o evitar el uso de metionina por esa ruta. El crecimiento celular puede controlarse a continuación mediante la adición de SAME al medio de fermentación.

20 **[0156]** Se ha identificado un sistema de transporte de SAME de alta afinidad por *Rickettsia* (Tucker y col., J. Bact. 185: 3031-3035, 2003). Este transportador de SAME tiene valores  $K_T$  de 2-8  $\mu$ M que son comparables a los valores para el transportador de *S. cerevisiae* (3,3  $\mu$ M), *P. carinii* (4,5  $\mu$ M) e hígado de rata (8,9  $\mu$ M). Además se ha comunicado que el sistema de transporte de SAME de *Rickettsia* puede complementar a un mutante de delección de *metK* de *E. coli* (Driskell y col., J. Bact. 187:5719-5722, 2005).

25 **[0157]** Las cepas W3110 y TF4076BJF se transformaron con un plásmido que contiene el transportador de SAM mencionado anteriormente. El gen *metK* de W3110 se inactivó y se verificó por PCR. Según estas

modificaciones, la nueva cepa debería haber sido capaz de crecer sólo en presencia de SAM, pero no sin este. Sin embargo, siguió creciendo en ausencia y en presencia de SAM exógeno.

#### 5 **E. Inactivación de transportadores de captación de metionina para aumentar la metionina en medio de fermentación**

5 **[0158]** Se han identificado dos transportadores de L-metionina en *E. coli*, uno con afinidad muy elevada ( $K_m = 0,1-0,13 \mu M$ ) y un segundo con menor afinidad ( $K_m = 20-40 \mu M$ ). El locus para el sistema de transportador de alta afinidad se designa como *metD* ya que los mutantes *metD* son incapaces de transportar D-metionina y de usarla como una fuente de metionina. El locus *metD* corresponde a los genes *abc* (*metN*), *yaeE* (*metI*) y *yaeC* (*metQ*) que codifican un transportador ABC necesario para captación de L-metionina y D-metionina. *metN* codifica la posible ATPasa y *metI* codifica la región de extensión de membrana del transportador ABC de *metD*. Se espera que el tercer componente, *metQ*, codifique el dominio de unión a sustrato. Dado que los mutantes *metI*, *metN* y *metQ* de delección pueden seguir creciendo en presencia de L-metionina, se considera una evidencia indirecta de la presencia del sistema *metP* de baja afinidad.

10 **[0159]** Tal como se ilustra en la FIG. 5, *metD* importa D- y L-metionina, mientras que el transportador no caracterizado genéticamente *metP* importa sólo L-metionina. MetD se representa como el transportador ABC típico con sus tres componentes: A, E y C representan *abc* (ATPasa), *yaeE* (permease) y *yaeC* (proteína de unión a D-metionina), respectivamente. (Merlin y col., J. Bacteriol. 184: 5513-5517, 2002).

15 **[0160]** Se mostró que *metJ*, la proteína represora de metionina global, controla negativamente la expresión del operón que codifica el locus *metD*. La transcripción de los genes *metD* aumenta con la privación de metionina, que es un correpresor de *metJ*. En células con delección de *metJ*, los transportadores se expresan de forma más intensa y no son reprimidos por metionina (Merlin y col., J. Bacteriol. 184: 5513-5517, 2002). Las cepas de producción de metionina tienen generalmente secuencias de *metJ* atenuadas o delecciones de *metJ* con lo que, para aumentar la producción, puede ser especialmente importante reducir la actividad de importación de metionina. Las cepas pueden ser modificadas mediante inactivación del sistema de captación de metionina de *metD*. Así se evitará la captación de metionina y se evitará el ciclo fútil potencial de derroche de energía de captación/excreción.

20 **[0161]** La inactivación de *metD* dio como resultado un aumento del 25% en la acumulación de metionina en el caldo de fermentación, según se mide mediante el protocolo de matraz de agitación descrito en el Ejemplo 3, anteriormente.

#### 25 **F. Expresión en exceso de *methH***

30 **[0162]** El aumento en el flujo de carbono a través de la vía de la metionina debido a las modificaciones en las cepas descritas en la presente memoria descriptiva puede conducir a una acumulación de homocisteína en el interior de la célula. La homocisteína es muy tóxica para la célula. Para evitar la acumulación y convertir la homocisteína en metionina, es muy importante tener una actividad de homocisteína-metilasa muy activa (EC 2.1.1.13 y 2.1.1.14) que son codificadas por *metE* y *methH*, respectivamente. Una forma de conseguirlo es expresar en exceso estos genes bien en un sistema de plásmidos o bien colocando la copia cromosómica bajo el control de un promotor intenso.

35 **[0163]** El *methH* natural de *E. coli* se expresó en exceso con varios promotores diferentes en una cepa que contenía las vías dobles *metABC* y *metXY*, y la producción de metionina se midió en nuestro protocolo estándar de matraz de agitación. Los tres vectores usados para expresión en exceso de *methH* fueron pCL-P(*cysK*), pCL-P(*pro*) y pCL-P(CJ-1) que fueron modificados respectivamente a partir del plásmido disponible comercialmente pCL1920 por sustitución del promotor Plac por el promotor del gen *cysK* de *E. coli*, el promotor del vector comercial pPROLar y el promotor propiedad de CJ Corporation CJ 1. El ORF del gen *methH* de *E. coli* se situaba justo en la dirección 3' de los promotores. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13, a continuación. Está claro que incluso para los niveles relativamente bajos de metionina acumulados en el protocolo de matraz de agitación, la presencia de una alta concentración de la homocisteína-metilasa tuvo un efecto positivo muy importante en la producción de metionina. El efecto fue más pronunciado todavía en los fermentadores.

Tabla 13

Efecto de la expresión en exceso de <i>metH</i> en la producción de metionina			
Cepas	DO	Glucosa usada g/l	Metionina producida mg/l
TF4076BJF <i>met YX Lm</i>	7,4	40,0	868
TF4076BJF <i>met YX Lm pcL-P (cysK) met H</i>	11,7	33,9	1289
TF4076BJF <i>met YX Lm pcL-P (pro) met H</i>	7,5	32,8	1062
TF4076BJF <i>met YX Lm pcL-P (CJ-1) met H</i>	12,4	40,0	1337
TF4076BJF <i>met YX Dr</i>	10	38,2	569
TF4076BJF <i>met YX Dr pcL-P (cysK) met H</i>	15,4	40,0	896
TF4076BJF <i>met YX Dr pcL-P (pro) met H</i>	12,5	40,0	786
TF4076BJF <i>met YX Dr pcL-P (CJ-1) met H</i>	15	40,0	856

### G. Mejora de la captación de sulfato y aumento de la reserva de APS en organismos que producen metionina

5 [0164] Este ejemplo describe un procedimiento de ingeniería de *E. coli* para sortear el producto intermedio, PAPS, en su asimilación endógena de la vía de azufre. La nueva vía creada requiere una molécula menos de ATP para cada molécula de sulfato reducida a sulfuro, así, es más eficiente en términos energéticos (véase FIG. 6).

10 [0165] Según se ha descrito anteriormente, la FIG. 6 muestra dos formas de aprovechar las vías alternativas de asimilación de azufre. Una forma consiste en clonar el gen *cysH* (EC 1.8.4.9) de adenilil-sulfato-reductasa, a partir de *Bacillus* o *P. aeruginosa* e incorporarlo en el genoma de *E. coli* o expresarlo a partir de un plásmido. Esto permite convertir APS en sulfito en una sola etapa, evitando así la conversión de APS en PAPS catalizada por APS-cinasa de *E. coli* (*cysC*). La segunda forma sería mutar el gen PAPS-reductasa de *E. coli*, basándose en los homólogos de *cysH* bacterianos, de manera que su especificidad de sustrato se cambie de PAPS a APS.

15 [0166] Los genes *cysH* de *Bacillus subtilis* 168 (Número de acceso AJ000974 REGIÓN: 548..1249) y *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Número de acceso NC\_002516 REGIÓN: 1895692..1896495) se clonaron en plásmidos y se sometieron a ensayo para determinar si podrían complementar a los mutantes de inactivación *cysC* o *cysH* de *E. coli*, que son auxótrofos de la cisteína y la metionina.

20 [0167] Brevemente, los genes *cysH* de *Bacillus subtilis* 168 y *Pseudomonas aeruginosa* PA01 se transformaron en BL21 (DE3) $\Delta$ *cysH*, una inactivación de *cysH* de BL21(DE3), para someter a ensayo la complementación. Se usaron colonias únicas de las siguientes cuatro cepas para inocular 5 ml de cultivos que contenían el medio Overnight Express (OnEX: medio definido suplementado con aminoácidos pero no cisteína o metionina) de Novagen.

25 [0168] Se incubaron los cultivos durante 48 h a 30°C con agitación constante. Los resultados, presentados en la Tabla 14, indican que el gen *cysH* de *B. subtilis* y *P. aeruginosa* fueron capaces de complementar la inactivación de *cysH* en *E. coli* y de sostener el crecimiento.

Tabla 14

### Densidad óptica a 600 nm de experimentos de complementación de $\Delta$ *cysH*

Cepa	DO <sub>600</sub>
BL21 (DE3) (cepa natural)	5,2
BL21 (DE3) $\Delta$ <i>cysH</i> (con delección de <i>cysH</i> )	0
BL21 (DE3) $\Delta$ <i>cysH</i> + pET23B <i>cysH</i> (adición de <i>cysH</i> de <i>Bacillus</i> )	7,2
BL21 (DE3) $\Delta$ <i>cysH</i> + pET23P <i>cysH</i> (adición de <i>cysH</i> de <i>Pseudomonas</i> )	6,8

35 [0169] Análogamente, se usó una cepa que tenía el gen *cysC* inactivado para someter a ensayo la complementación por los genes *cysH* de *B. subtilis* y *P. aeruginosa*. La cepa BL21(DE3)  $\Delta$ *cysC* se transformó con plásmidos pET23a, pET23a+*cysH* (*B. subtilis*) y pET23a+*cysH* (*P. aeruginosa*), respectivamente. Se inocularon colonias únicas de las tres cepas anteriores junto con BL21 (DE3) en 5 ml de medio OnEx que contenía aminoácidos excepto L-cisteína y L-metionina. Se cultivaron las células a 37°C con agitación durante 48 h y se midió el crecimiento por DO<sub>600nm</sub>. Los resultados, mostrados en la Tabla 15, indicaron que la APS-reductasa codificada por *cysH* de *B. subtilis* y *P. aeruginosa* podría complementar la mutación de *cysC* en BL21 (DE3) lo que demostró que era posible sortear la formación de PAPS.

45

Tabla 15

Densidad óptica a 600 nm de experimentos de complementación de  $\Delta$ cysC

cepa	DO <sub>600nm</sub> <sup>a</sup>
BL21 (DE3)	4,5
BL21 (DE3) $\Delta$ cysC +pET23a	0,0
BL21 (DE3) $\Delta$ cysC +pET23a +cysH ( <i>B. subtilis</i> )	2,5
BL21 (DE3) $\Delta$ cysC +pET23a +cysH ( <i>P. aeruginosa</i> )	4,2
<sup>a</sup> Los resultados son el promedio de tres cultivos.	

5

*Expresión en exceso of enzimas en la vía de asimilación de azufre*

[0170] Según se describe anteriormente, para aumentar la producción de metionina puede resultar útil tener una vía de asimilación de azufre muy eficaz. Para facilitar la sulfhidrilación directa del precursor de acilhomoserina, es esencial la disponibilidad de SH<sub>2</sub>. Todos los genes principales de la vía de asimilación de azufre se clonaron y se expresaron en exceso en la cepa de producción de metionina TF4076BJF. Los genes expresados en exceso fueron:

10

cys PUWA: sulfato-permeasa

cysDN: ATP sulfurilasa (EC 2.7.7.4)

15

CysCCysH: APS-cinasa y PAPS-sulfotransferasa (EC 2.7.1.25 y EC 1.8.4.8)

CysJcysG: NADPH-sulfito-reductasa (EC 1.8.1.2)

CysB: activador de transcripción

[0171] Estos genes se expresaron en exceso en una cepa que contenía las vías dobles de *metABC* y *metXY*, y se midió la producción de metionina en nuestro protocolo estándar de matraz de agitación. Los cinco grupos mencionados anteriormente de genes de asimilación de sulfato se clonaron respectivamente en el vector pCL-(Prmf) que se construyó sustituyendo el promotor Plac de plásmido pCL1920 por el promotor del gen *rmf* de *E. coli*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16 a continuación:

25

Tabla 16

Resultados de la expresión en exceso de varias enzimas de vías de asimilación de azufre			
Cepas	DO	Met mg/l	Met/DO
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm)	8,0	934	116
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm) <i>cysPUWA</i>	4,2	206	49
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm) <i>cysDN</i>	10,3	1271	123
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm) <i>cysCcysH</i>	9,9	1348	136
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm) <i>cysJcysG</i>	7,7	1038	134
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm) <i>cysB</i>	9,4	425	45

[0172] La expresión en exceso de las enzimas de transporte así como el regulador de transcripción dieron como resultado una menor producción de metionina y una disminución importante en la cantidad de metionina por unidad de masa celular. El aumento de la actividad de la sulfurilasa, la APS-cinasa y la sulfotransferasa dieron como resultado un aumento en la producción de metionina por unidad de células así como la metionina total producida. Dado que estos aumentos se observan en una cepa que contiene dos plásmidos diferentes, puede esperarse que los resultados se mejoren mucho más una vez que se ajuste y se optimice la expresión de las enzimas.

30

## Ejemplo 4. Producción de ejemplo de cepas de metionina

35

[0173] Tal como se describe anteriormente, las diversas modificaciones genéticas descritas en la presente memoria descriptiva puede prepararse a través de la incorporación de secuencias de ADN recombinante independientes del cromosoma, o bien las secuencias de ADN recombinante pueden incorporarse en el cromosoma de la cepa de producción. Las secuencias de ADN recombinante pueden incorporarse en las células hospedadoras como una copia única o en múltiples copias.

40

i) Se diseña un microorganismo, como ATCC # 13070 o TF4076 de *E. coli*, por ingeniería para que contenga una delección funcional de *thrB* y *metJ* de manera que los genes se atenúen. Este microorganismo expresa los genes *metX* y *metY*, así como una secuencia de ácidos nucleicos recombinantes que provoca la expresión en exceso del gen *metH* natural. La expresión de *metX* y *metY* introduce una vía adicional en *E. coli* y la expresión en exceso del

45

gen *metH* natural provoca un aumento en el flujo de homocisteína en metionina.

5 ii) Se crea otra cepa de producción realizando las siguientes modificaciones en el microorganismo descrito en i). El microorganismo descrito en i) se modifica adicionalmente transformando el microorganismo con una molécula de ADN recombinante que codifica un gen *metZ* activo, como el de *Pseudomonas aeruginosa*.

10 iii) Se crea otra cepa de producción más realizando las siguientes modificaciones en el microorganismo descrito en i). El microorganismo descrito en i) se modifica adicionalmente para sustituir el gen *metA* natural por un gen *metA* resistente a la inhibición de retroalimentación, como los descritos en el Ejemplo 3.

iv) Se crea otra cepa de producción realizando las siguientes modificaciones en el microorganismo descrito en iii). El microorganismo descrito en iii) se transforma con un gen *metZ* activo.

15 v) Se crea otra cepa de producción realizando las siguientes modificaciones en el microorganismo descrito en i). El microorganismo descrito en i) que expresa en exceso el producto del gen *metF* se modifica adicionalmente para atenuar el gen represor transcripcional *lacI*.

20 vi) Se crean cepas de producción adicionales realizando las siguientes modificaciones en cualquiera de las cepas de producción descritas en la presente memoria descriptiva. Las cepas de producción se diseñan por ingeniería para expresar en exceso los genes *cysDN*, *cysIJ* o *cysCH* o combinaciones de los mismos con el fin de mejorar la asimilación de azufre. Opcionalmente, estas cepas de producción se modifican adicionalmente para sustituir *cysC* y *cysH* nativos de *E. coli* por un único gen *cysH* de *P. aeruginosa* o *B. subtilis*.

25 vii) Se prepara otra cepa de producción modificando cualquiera de las cepas de producción descritas en la presente memoria descriptiva de manera que el gen importador de metionina *metD* esté atenuado.

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0174]**

30 <110> Cargill, Incorporated CJ Corporation

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS DE PRODUCCIÓN DE METIONINA

35 <130> P48357EP-K/NCB

<140> EP07775377,0

<141> 2007-04-11

40 <160> 34

<170> PatentIn versión 3,3

<210> 1

45 <211> 930

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 1

50

ES 2 400 261 T3

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccgcttaa ggttctgatc     120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac     180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcattcgatt cccgtgaatc gcgcaacacg     240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt     300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgtcgcttac     360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt     420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc     480
accgaacaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg     540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggctgcg     600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat     660
ctgttagcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg     720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg     780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac     840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accggatcac gccatacgat     900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa                                     930

```

<210> 2

5 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 2

10

```

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
1          5          10          15
Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu
          20          25          30

```



ES 2 400 261 T3

Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile  
 35 40 45

Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln  
 50 55 60

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr  
 65 70 75 80

Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln  
 85 90 95

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu  
 100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu  
 115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala  
 130 135 140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg  
 145 150 155 160

Thr Glu Gln Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His  
 165 170 175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser  
 180 185 190

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu  
 195 200 205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Leu Ala Ser  
 210 215 220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala  
 225 230 235 240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp  
 245 250 255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr  
 260 265 270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp  
 275 280 285

Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Arg Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met  
 290 295 300

Asn Pro Thr Leu Asp  
 305

<210> 3  
 <211> 930

ES 2 400 261 T3

<212> ADN  
<213> Escherichia coli

<400> 3

5

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgtga agaaaacgtc      60
tttgtgatgt caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc     120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac     180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcattcgatt ctctggaatc gcgcaacacg     240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt     300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgcgcttac     360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt     420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc     480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg     540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg     600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat     660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg     720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg     780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagagagctg gcgtagtcac     840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcgc gccatacgat     900
ctacggcaca tgtatccaac gctggattaa                                     930
    
```

<210> 4  
<211> 309  
<212> PRT  
<213> Escherichia coli

10

<400> 4

```

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
 1           5           10           15
Glu Glu Asn Val Phe Val Met Ser Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu
           20           25           30
Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile
           35           40           45
Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln
 50           55           60
    
```

15

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln  
 85 90 95  
 Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu  
 100 105 110  
 Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu  
 115 120 125  
 Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala  
 130 135 140  
 Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His  
 165 170 175  
 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser  
 180 185 190  
 Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu  
 195 200 205  
 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser  
 210 215 220  
 Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala  
 225 230 235 240  
 Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp  
 245 250 255  
 Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr  
 260 265 270  
 Pro Arg Glu Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp  
 275 280 285  
 Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Ala Pro Tyr Asp Leu Arg His Met  
 290 295 300  
 Tyr Pro Thr Leu Asp  
 305

<210> 5  
 <211> 930

ES 2 400 261 T3

<212> ADN  
 <213> Escherichia coli

<400> 5

5

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgtga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc     120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac     180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg     240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt     300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgtcgcttac     360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt     420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaac atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc     480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg     540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg     600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat     660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg     720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg     780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac     840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctccac tattacgtct accagatcac gccatacgat     900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa                                     930
  
```

<210> 6  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10

<400> 6

ES 2 400 261 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg  
 1 5 10 15

Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu  
 20 25 30

Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile  
 35 40 45

Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln  
 50 55 60

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr  
 65 70 75 80

Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln  
 85 90 95

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu  
 100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu  
 115 120 125  
 Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala  
 130 135 140  
 Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His  
 165 170 175  
 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser  
 180 185 190  
 Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu  
 195 200 205  
 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser  
 210 215 220  
 Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala  
 225 230 235 240  
 Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp  
 245 250 255  
 Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr  
 260 265 270  
 Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp  
 275 280 285  
 Leu His Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met  
 290 295 300  
 Asn Pro Thr Leu Asp  
 305

- <210> 7
- <211> 930
- 5 <212> ADN
- <213> Escherichia coli
- <400> 7

ES 2 400 261 T3

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgcctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc     120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcccct gctttcaaac     180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg     240

cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt     300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcttggtgg ggtttaatga tgctgcttac     360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtct     420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc     480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg     540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg     600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggagaagg ggatgcatat     660
ctgtttgccg gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg     720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg     780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac     840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat     900
ctacggcaca tgaaccaac gctggattaa                                     930

```

5 <210> 8  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 8

ES 2 400 261 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg  
 1 5 10 15

Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Pro Gly Gln Glu  
 20 25 30

Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile  
 35 40 45

Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln  
 50 55 60

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr  
 65 70 75 80

Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln  
 85 90 95

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu  
 100 105 110

Val Gly Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu  
 115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Ser Val Cys Trp Ala  
 130 135 140



Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His  
 165 170 175  
 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser  
 180 185 190  
 Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu  
 195 200 205  
 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser  
 210 215 220  
 Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala  
 225 230 235 240  
 Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp  
 245 250 255  
 Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr  
 260 265 270  
 Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp  
 275 280 285  
 Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met  
 290 295 300  
 Asn Pro Thr Leu Asp  
 305

- <210> 9
- <211> 930
- 5 <212> ADN
- <213> Escherichia coli
- <400> 9

ES 2 400 261 T3

atgccgattc	gtgtgccgga	cgagctaccc	gccgtcaatt	tcttgcgtga	agaaaacgtc	60
tttgtgatga	caacttctcg	tgcgtctggt	caggaaattc	gtccacttaa	ggttctgatc	120
cttaacctga	tgccgaagaa	gattgaaact	gaaaatcagt	ttctgcgctt	gctttcaaac	180
tcacctttgc	aggtcgatat	tcagctgttg	cgcatcgatt	cccgtgaatc	gcgcagcacg	240
cccgcagagc	atctgaacaa	cttctactgt	aactttgaag	atattcagga	tcagaacttt	300
gacggtttga	ttgtaactgg	tgcgccgctg	ggcctggtgg	agtttaatga	tgtcgcttac	360
tggccgcaga	tcaaacaggt	gctggagtg	tcgaaagatc	acgtcacctc	gacgctgatt	420
gtctgctggg	cggtacaggc	cgcgctcaat	atcctctacg	gcattcctaa	gcaaactcgc	480
accgaaaaac	tctctggcgt	ttacgagcat	catattctcc	atcctcatgc	gcttctgacg	540
cgtggctttg	atgattcatt	cctggcaccg	cactcgcgct	atgctgactt	tccggcagcg	600
ttgattcgtg	attacaccga	tctggaaatt	ctggcagaga	cggaagaagg	ggatgcatat	660
ctgtttgcca	gtaaagataa	gcgcattgcc	tttgtgacgg	gccatcccga	atatgatgcg	720
caaacgctgg	cgcaggaatt	tttccgcgat	gtggaagccg	gactagaccc	ggatgtaccg	780
tataactatt	tcccgcacaa	tgatccgcaa	aatacaccgc	gagcgagctg	gcgtagtcac	840
ggtaatttac	tgtttaccaa	ctggctcaac	aattacgtct	accagatcac	gccatacgat	900
ctacggcact	tgaatccaac	gctggattaa				930

<210> 10  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

5

<400> 10

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

ES 2 400 261 T3

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu  
 195 200 205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser  
 210 215 220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala  
 225 230 235 240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp  
 245 250 255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr  
 260 265 270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp  
 275 280 285

Leu Asn Asn Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Leu  
 290 295 300

Asn Pro Thr Leu Asp  
 305

<210> 11  
 <211> 28  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador de PCR  
 10 <400> 11  
 gctagccatg gttaaagttt atgccccg 28

15 <210> 12  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 12

25 gagctcttag tttccagta ctcgtgocg 29  
 <210> 13  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 13

**atggctgaat ggagcggcga atatatcagc ccatacgtg agcacggcaa ggtgtaggct 60**

**ggagctgctt c 71**

5

<210> 14  
 <211> 65  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> Cebador de PCR

15

<400> 14

**gtattcccac gtctccgggt taatcccat ctcacgatg atctccatat gaatattctc 60**

**cttag 65**

20

<210> 15  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 15

gggcttgtc ggtgaaatg 19

30

<210> 16  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35

<220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 16

40

actttgcat gagcgagag 19

45

<210> 17  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50

<220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 17

gctagccatg agctttttc acgccag 27

<210> 18

<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Cebador de PCR  
  
<400> 18

10 gagctcttat aaaccaggtc gaacc 26  
  
<210> 19  
<211> 26  
<212> ADN  
15 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador de PCR

20 <400> 19  
  
cagctgatga gctttttca cgccag 26

<210> 20  
25 <211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
30 <223> Cebador de PCR  
  
<400> 20

aagcttttat aaaccaggtc gaacc 26

35 <210> 21  
<211> 32  
<212> ADN  
40 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador de PCR

<400> 21

45 cggggtacca ccgcgggcct attccattac at 32  
  
<210> 22  
<211> 32  
50 <212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador de PCR

55 <400> 22  
  
acgcatatc ttaatctcct agattgggtt tc 32

60 <210> 23  
<211> 28  
<212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 5 <400> 23  
 cggggtacct gggtacaaca acgcctgg 28  
 10 <210> 24  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 24  
 20 catgatattt acctcgttac ctttggtcg 29  
 <210> 25  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 30 <400> 25  
**ttactctggt gcctgacatt tcaccgacaa agcccagggga acttcatcac gtgtaggctg 60**  
**gagctgcttc 70**  
 35 <210> 26  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 26  
**ttaccaccttg ttgacagccc ggaagccatt ttccaggtcg gcaattaaat catatgaata 60**  
**tcctcctta 69**  
 45 <210> 27  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 27  
 55

	<b>caatttcttg cgtgaagaaa acgtctttgt gatgacaact tctcgtgcgt gtgtaggctg</b>	<b>60</b>
	<b>gagctgcttc c</b>	<b>71</b>
5	<210> 28 <211> 70 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR  <400> 28	
	<b>aatccagcgt tggattcatg tgccgtagat cgtatggcgt gatctggtag catatgaata</b>	<b>60</b>
	<b>tcctccttag</b>	<b>70</b>
15	<210> 29 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR  <400> 29	
25	<b>aatggatcct gccgtgagcg gcgaatac</b>	<b>28</b>
30	<210> 30 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador de PCR  <400> 30	
	agctctagac tgctgaggta cgtttcgg 28	
40	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador de PCR  <400> 31	
50	cgaagtaatc gcaacatccg 20	
55	<210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial  <220>	



# ES 2 400 261 T3

<223> Cebador de PCR

<400> 32 20

5 gtctgctatg tgggtctatc 20

<210> 33

<211> 31

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

15 <400> 33

gccaggatcc gatgacgctt aacaggcca c 31

<210> 34

20 <211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Cebador de PCR

<400> 34

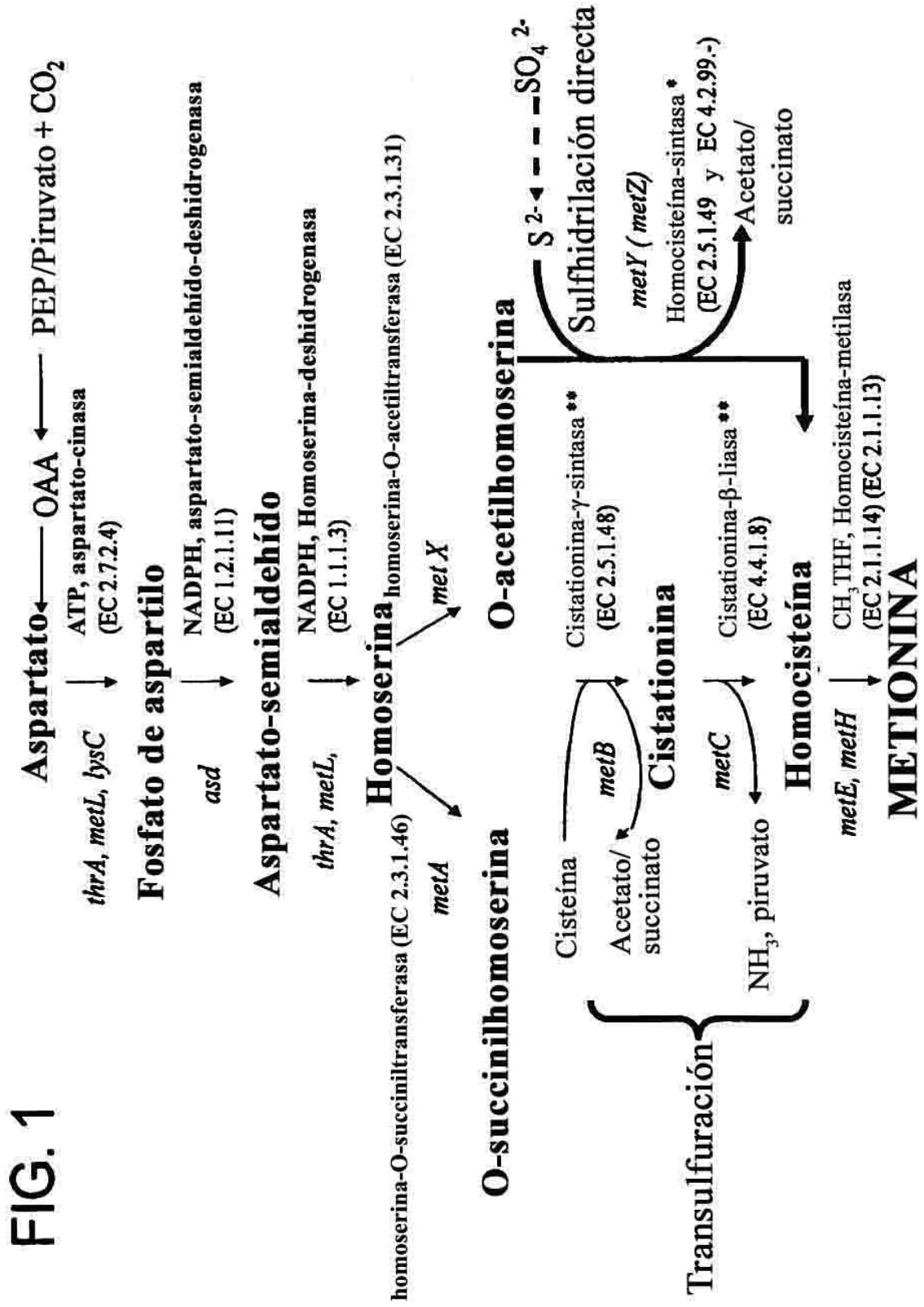
ccgcaagctt ttaccctt gttgcagcc 30

30

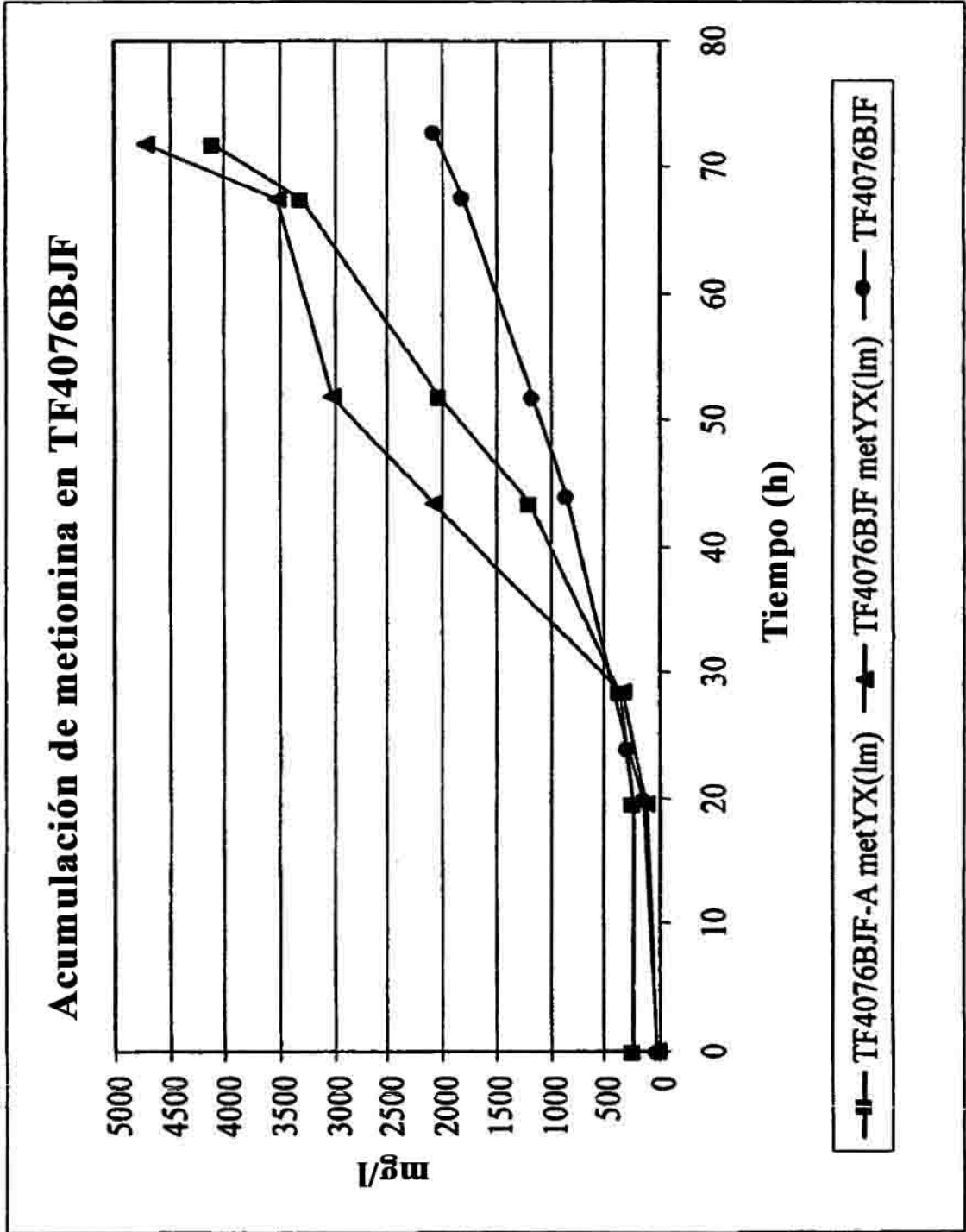
**REIVINDICACIONES**

1. Una *E. coli* aislada para producir metionina, comprendiendo la *E. coli* aislada:
- 5 uno o más primeros péptidos que comprenden la actividad de sulfhidrilación directa de homocisteína-sintasa, en el que los péptidos usan O-acetil-L-homoserina (OAHS) u O-succinil-L-homoserina (OSHS) como sustrato;
- uno o más segundos péptidos que comprenden la actividad de transulfuración de cistationina- $\gamma$ -sintasa y cistationina- $\beta$ -liasa; y
- 10 un péptido de homoserina-O-succiniltransferasa que comprende las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10,
- en el que la actividad de sulfhidrilación directa procede de la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos exógena que codifica homocisteína-sintasa.
- 15 2. La *E. coli* aislada de la reivindicación 1, en la que al menos el 10% de la metionina producida procede de la actividad de transulfuración.
3. La *E. coli* aislada de la reivindicación 1, en la que al menos el 10% de la metionina producida procede
- 20 de la actividad de sulfhidrilación directa.
4. La *E. coli* aislada de la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de ácidos nucleicos exógena que codifica una adenilil-sulfato-reductasa.
- 25 5. La *E. coli* aislada de la reivindicación 1, en la que al menos un gen seleccionado entre *metD*, *metK*, *metJ*, *thrB*, *serA* o combinaciones de los mismos está atenuado.
6. La *E. coli* aislada de la reivindicación 1, en la que al menos un gen seleccionado entre *metA*, *metB*, *metC*, *metE*, *metY*, *metZ*, *metX*, *metH*, *cysPWUA*, *cysD*, *cysN*, *cysC*, *cysH*, *cysI*, *cysJ*, *cysG*, *csyK*, *cysM*, y
- 30 combinaciones de los mismos, está expresado en exceso.
7. Un procedimiento de preparación de metionina que comprende:
- 35 cultivo de la *E. coli* aislada de la reivindicación 1 en condiciones que permiten la producción de metionina;
- y aislamiento de la metionina.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la *E. coli* aislada comprende un primer péptido que
- 40 tiene actividad de homocisteína-sintasa para sulfhidrilación directa, en el que el primer péptido está codificado por *metZ*, *metY* o combinaciones de los mismos.
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la *E. coli* aislada comprende un segundo péptido que
- 45 tiene actividad de cistationina- $\gamma$ -sintasa y actividad de cistationina- $\beta$ -liasa para transulfuración, en el que el segundo péptido está codificado por *metB* y *metC*.
10. La *E. coli* aislada de la reivindicación 1, que comprende además un péptido de homoserina-O-acetiltransferasa.
11. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el primer péptido es un péptido de homocisteína-
- 50 sintasa codificado por *metY*.
12. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el primer péptido es un péptido de homocisteína-sintasa codificado por *metZ*.
- 55 13. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el microorganismo comprende además al menos uno entre un gen atenuado seleccionado entre *metD*, *metK*, *metJ*, *thrB*, *serA* o combinaciones de los mismos.
14. La *E. coli* aislada de la reivindicación 1, que comprende además una cistationina-gamma-sintasa expresada a partir de una secuencia de ácidos nucleicos endógena y una homocisteína-sintasa expresada a partir
- 60 de una secuencia de ácidos nucleicos exógena.
15. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la *E. coli* aislada comprende además una molécula

de ADN recombinante que expresa en exceso adenilil-sulfato-reductasa.



**FIG. 2**



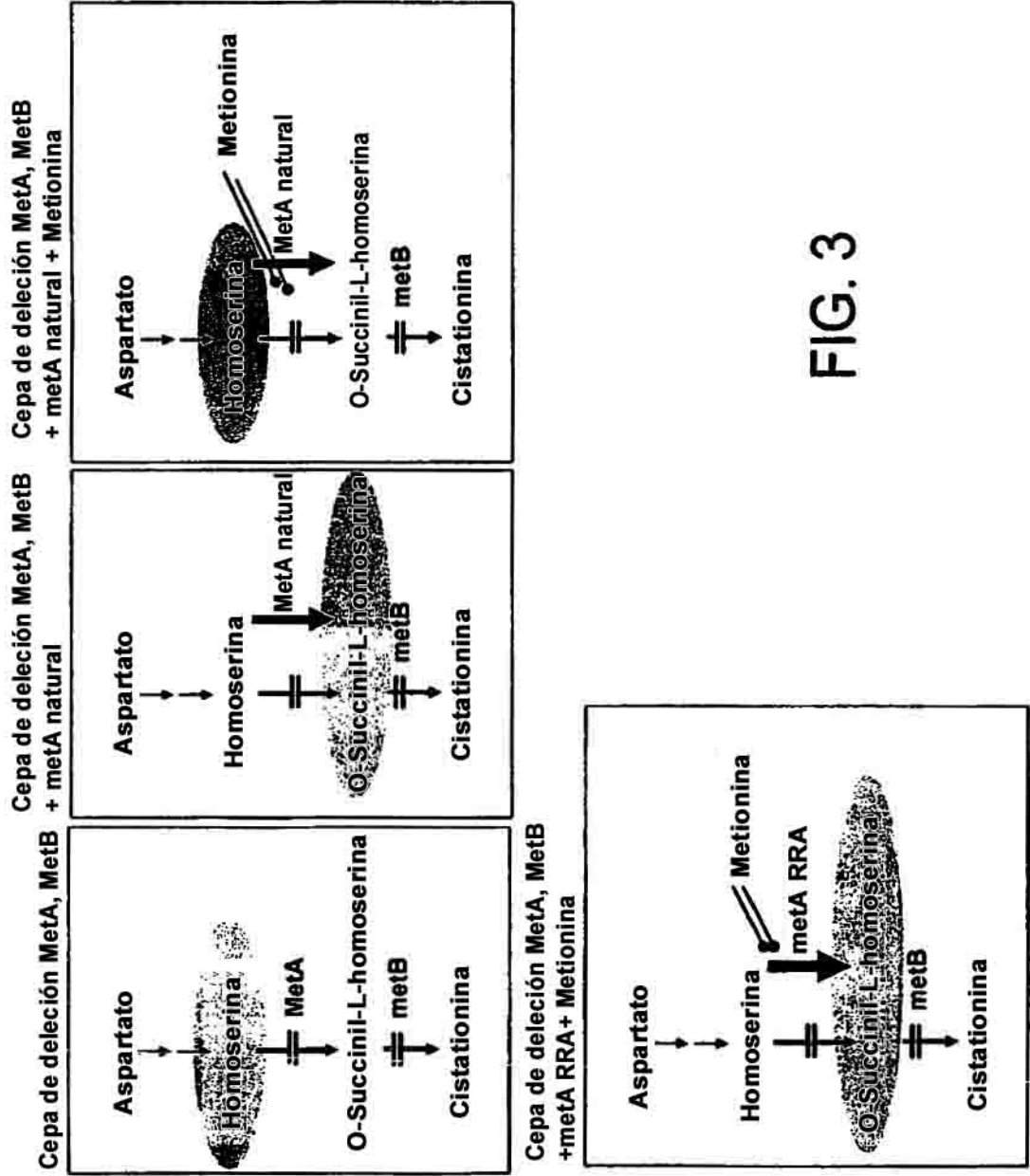


FIG. 3

metA RRA: resistente a retroalimentación

FIG.4

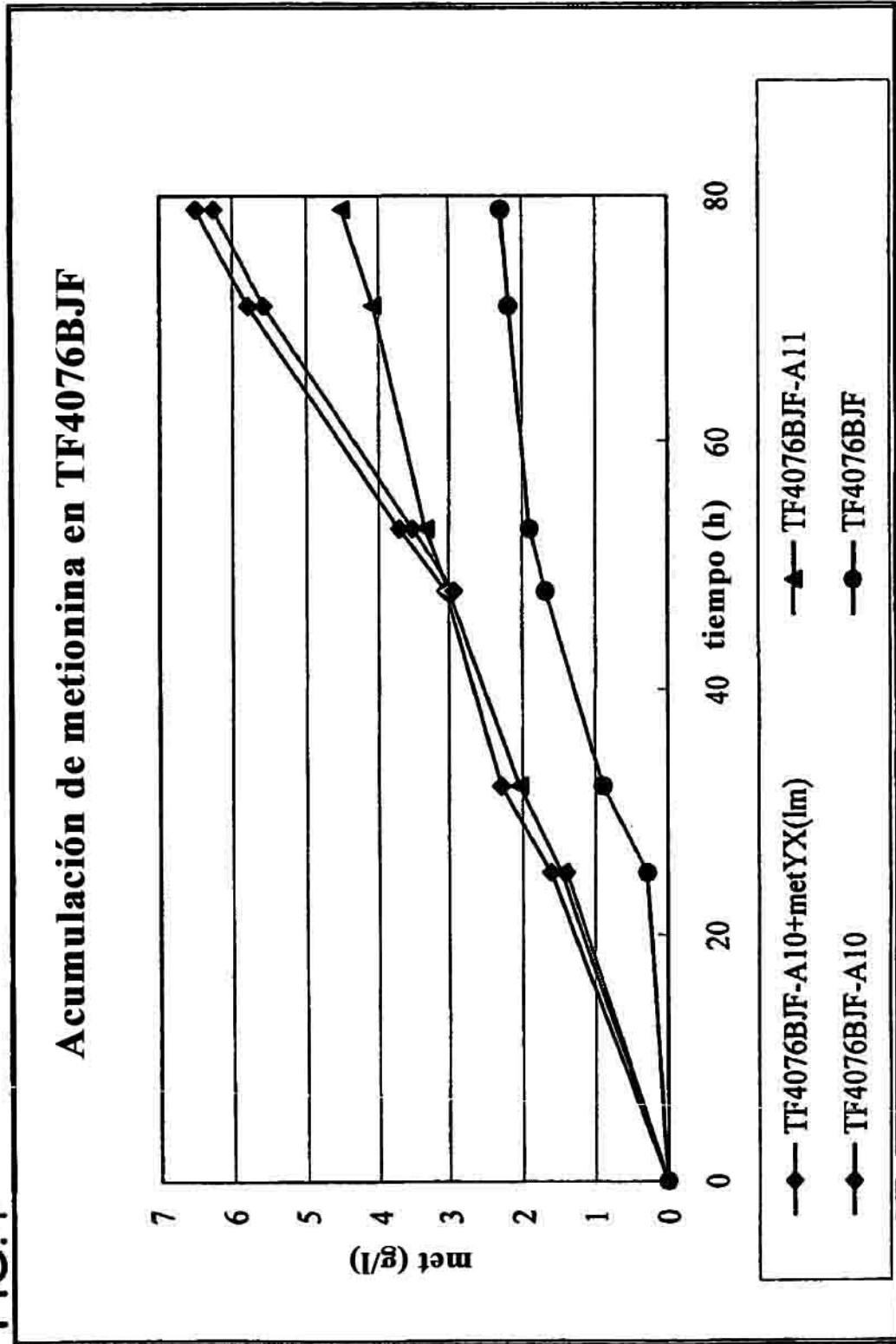
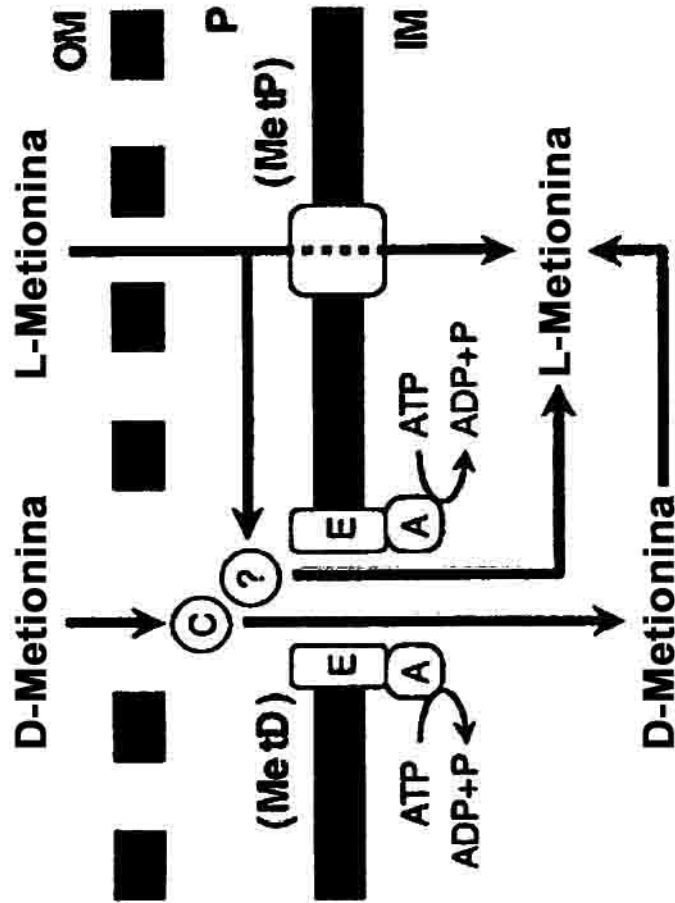
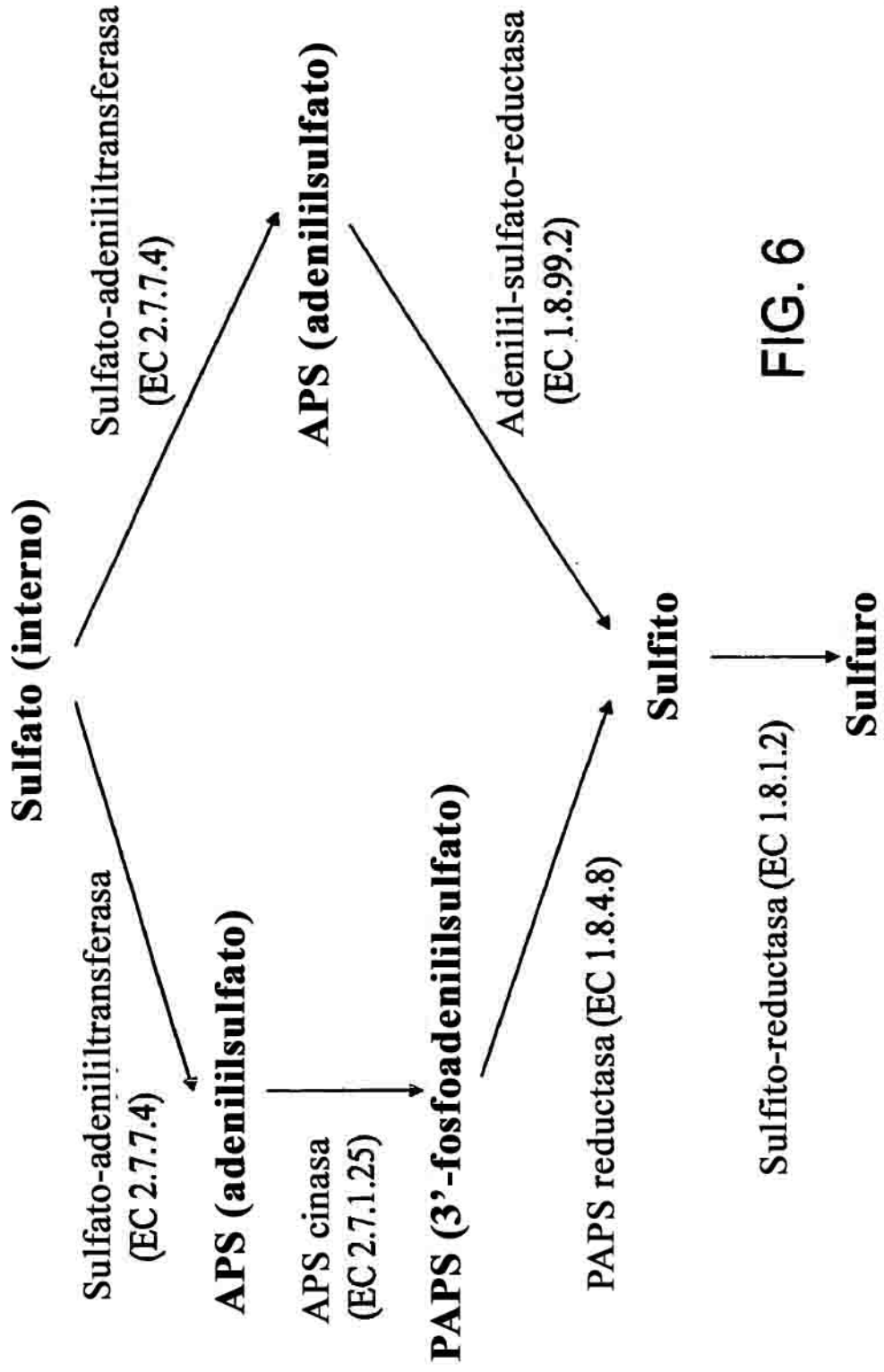


FIG. 5





**Vía de *E. coli* natural para asimilación de azufre**      **Vía alternativa**



**FIG. 6**