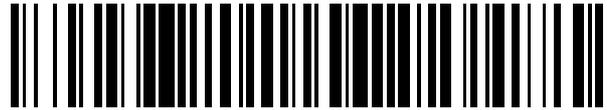


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 495**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2010 E 10818101 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2658987**

54 Título: **Producción fermentativa de análogo hidroxilado de metionina (MHA)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.02.2015**

73 Titular/es:

**METABOLIC EXPLORER (100.0%)  
Biopole Clermont-Limage  
63360 Saint Beuzire, FR**

72 Inventor/es:

**FIGGE, RAINER y  
DISCHERT, WANDA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 528 495 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**

Producción fermentativa de análogo hidroxilo de metionina (MHA).

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butírico (HMBA), un análogo del aminoácido esencial metionina, por fermentación. La fermentación es un proceso biológico en el cual un microorganismo, empleando el carbono, el azufre y el nitrógeno proporcionados en el medio de cultivo, biosintetiza un producto de interés que habitualmente se sintetiza químicamente.

**Antecedentes de la técnica**

El ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butírico (HMBA), comúnmente denominado "hidroximetionina" es un análogo del aminoácido esencial metionina, y un importante aditivo para alimentos. Habitualmente se utiliza en dietas para aves de corral ya que se considera que la metionina es el primer aminoácido limitante en los alimentos comerciales a base soja y maíz.

El análogo hidroxilo de metionina contiene un radical hidroxilo en el carbono  $\alpha$  de la molécula de metionina en lugar de un grupo amino. El HMBA tiene la fórmula:



A diferencia del aminoácido, éste no es utilizado directamente por el organismo en la síntesis de proteínas, porque es necesario convertirlo anabólicamente en el aminoácido que se ha de usar. El HMBA no se emplea en su forma pura, sino de otras diversas formas, a saber:

- una mezcla de sales de calcio y amonio del HMBA (patentes US nº 2.745.745 y nº US 2.938.053),
- soluciones acuosas ácidas (patente US nº 4.353.924),
- sales de calcio de HMBA, obtenidas mediante el proceso descrito en la patente US nº 3.175.000.

Hace mucho tiempo que se conoce la preparación de HMBA por vía química. Existen varias patentes pertenecientes a NOVUS International (PCT/US98/01595), MONSANTO Company (EP0142488), BRITISH Telecom (EP0143000) o Rhone Poulenc Animal Nutrition S.A. (US 6.180.359) que describen la hidrólisis del 2-hidroxi-4-metiltiohidroxibutironitrilo (HMBN) en HBMA en un proceso de dos etapas. Todas estas tecnologías se basan aproximadamente en la misma materia prima y en los mismos compuestos intermedios principales.

La primera etapa consiste en poner el 2-hidroxi-4-metiltiobutironitrilo (HMBN) en contacto con ácido inorgánico fuerte tal como ácido clorhídrico o sulfúrico. En una etapa subsiguiente, después de la dilución con agua, se completa la hidrólisis a una temperatura más alta. El HMBA es extraído entonces con solvente orgánico, que no sea muy miscible en agua, tal como cetona, y por último se retira el solvente por electroporación.

La amida 2-hidroxi-4-metiltiobutironitrilo (HMBN) es sintetizada por una reacción entre metil-mercapto-propionaldehído (MMP) y ácido cianhídrico (HCN) o cianuro de sodio (NaCN).

Durante los últimos años, se han desarrollado nuevos procedimientos que comprenden enzimas o material biológico. Por ejemplo, Aventis Animal Nutrition S. A. ha descrito y patentado un procedimiento para la preparación de HMBA mediante hidrólisis enzimática del compuesto intermedio 2-hidroxi-4-metiltiobutironitrilo. La invención se basa en la bioconversión del HMBN después de poner en contacto a la molécula con material biológico inmovilizado que cuenta con actividad nitrilasa (patente US 6.180.359). Un proceso similar fue descrito por Novus respecto de la conversión enzimática del 2-hidroxi-4-(metiltio)-butanonitrilo a 2-hidroxi-4-(metiltio)-butanamida o ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)-butanoico o sales (documento de patente WO1998032872).

En su búsqueda de mejorar la producción de metionina a través de microorganismos, los inventores de la presente han descubierto sorprendentemente que la hidroximetionina también puede ser producida en un microorganismo a partir de una fuente de carbono simple en un proceso fermentativo. Este es el primer informe que se tiene de una producción totalmente biológica de un análogo hidroxilo de metionina.

**Sumario de la invención**

La invención se refiere a un procedimiento para la producción fermentativa de hidroximetionina, que comprende las etapas de:

- cultivar un microorganismo recombinante modificado para producir metionina en un medio de cultivo

apropiado, que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno,

- recuperar hidroximetionina del medio de cultivo, en el que el microorganismo recombinante es cultivado en condiciones de limitación de nitrógeno.

La producción fermentativa se basa en el crecimiento de microorganismos, donde una fuente de carbono simple, generalmente un azúcar, es utilizada por los microorganismos tanto para su propio crecimiento como para la biosíntesis de un compuesto de interés.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir hidroximetionina, en el que un microorganismo recombinante optimizado para la producción de metionina produce hidroximetionina a partir de una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno.

### • Producto

Las expresiones "hidroximetionina" o "análogo hidroxilado de metionina" o "MHA" o "ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butírico" o "ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanoico" o "HMTBA" o "HMBA" o "ácido DL-2-hidroxi-4-(metilmercapto)butanoico" se usan indistintamente para designar el producto de fermentación.

### • Microorganismos

La presente invención se refiere al uso de un microorganismo optimizado para la producción de metionina, para producir hidroximetionina.

Las expresiones "microorganismo para la producción de metionina" o "microorganismo productor de metionina" o "microorganismo modificado para producir metionina" o "microorganismo optimizado para la producción de metionina" designan un microorganismo que produce niveles de metionina más altos que los microorganismos no productores, que sólo producen metionina para sus necesidades endógenas, mientras que el microorganismo modificado produce más metionina de la que es necesaria para el metabolismo del microorganismo. Los microorganismos optimizados para la producción de metionina son desde ya conocidos en la técnica, y han sido descritos en particular en las solicitudes de patente WO2005/111202, WO2007/077041 y WO2009/043803.

La expresión "microorganismo recombinante" o "microorganismo modificado" designa un microorganismo modificado genéticamente por la adición o supresión de genes, o modificando la regulación de la expresión de algunos genes.

De acuerdo con la invención, la cantidad de metionina producida por el microorganismo recombinante, y particularmente el rendimiento de metionina (proporción de gramos/mol de metionina producidos por gramos/mol de la fuente de carbono), es más elevada en el microorganismo modificado si se compara con el correspondiente microorganismo no modificado. Las modificaciones usuales incluyen delección de genes por transformación y recombinación, reemplazos de genes, y sobreexpresión de genes o introducción de vectores para la expresión de genes heterólogos.

Estos microorganismos optimizados para la producción de metionina pueden producir hidroximetionina al mismo tiempo. Los inventores de la presente han observado que si los microorganismos producen más metionina, también se produce más hidroximetionina.

El microorganismo que se utiliza en la invención es una bacteria, una levadura o un hongo. Preferentemente, el microorganismo se selecciona de entre *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae* y *Corynebacteriaceae*. Más preferentemente, el microorganismo es del género *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Salmonella* o *Corynebacterium*. Incluso más preferentemente, el microorganismo es la especie *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum*.

### • Fermentación

Las expresiones "proceso fermentativo", "cultivo" o "fermentación" se usan indistintamente para referirse al crecimiento de bacterias en un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente de carbono simple, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno.

En el proceso fermentativo de la invención, la fuente de carbono se usa simultáneamente para:

- producción de biomasa: crecimiento del microorganismo convirtiendo, entre otras cosas, la fuente de carbono del medio, y

- producción de hidroximetionina y/o metionina: transformación de la misma fuente de carbono en hidroximetionina y/o metionina por la biomasa.

5 Las dos etapas son concomitantes, y la transformación de la fuente de carbono por el microorganismo para crecer da como resultado la producción de hidroximetionina y/o metionina en el medio, dado que el microorganismo comprende una ruta metabólica que permite dicha conversión.

10 La fermentación es un proceso clásico que puede realizarse en condiciones aeróbicas, microaeróbicas o anaeróbicas.

10 La fermentación se realiza generalmente en fermentadores con un medio de cultivo apropiado adaptado para el microorganismo que se ha de usar, que contiene por lo menos una fuente de carbono simple y, si es necesario, cosustratos para la producción de metabolitos.

15 En la invención, la fermentación se hace en un modo de alimentación por lotes. Esto se refiere a un tipo de fermentación en la que se añade medio de crecimiento suplementario durante la fermentación, pero no se retira ningún cultivo hasta finalizar con los lotes (excepto por pequeños volúmenes de muestras y análisis de HPLC/GCMS). El proceso comprende dos etapas principales; la primera es una serie de precultivos en un medio mineral apropiado para cultivo en lote y un medio mineral para cultivo con alimentación por lotes. A continuación se  
20 usa un fermentador cargado con medio mínimo apropiado para cultivo en lote para hacer trabajar el cultivo con diferentes medios para cultivo con alimentación por lotes de acuerdo con la producción deseada.

25 Los expertos en la técnica pueden definir las condiciones de cultivo y la composición del medio de cultivo para los microorganismos de acuerdo con la invención. En particular, se hace fermentar las bacterias a una temperatura entre 20°C y 55°C, preferentemente entre 25°C y 40° C, y más específicamente aproximadamente 30°C para *C. glutamicum* y aproximadamente 37°C para *E. coli*.

30 Un ejemplo de medio de cultivo conocido para *E. coli* es un medio de cultivo que puede ser una composición idéntica o similar a un medio M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un medio M63 (Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) o un medio como el definido por Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270: 88-96).

35 Como un ejemplo de medio de cultivo conocido para *C. glutamicum*, el medio de cultivo puede ser una composición idéntica o similar a un medio BMCG (Liebl *et al.*, 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210) o a un medio como el definido por Riedel *et al.* (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583).

40 La expresión "fuente de carbono" de acuerdo con la invención indica cualquier fuente de carbono que los expertos en la técnica puedan emplear para dar sustento al crecimiento normal de un microorganismo, que puede consistir en hexosas tales como glucosa, galactosa o lactosa; pentosas; monosacáridos; disacáridos como sacarosa (melaza), celobiosa o maltosa; oligosacáridos tales como almidón o sus derivados; hemicelulosas; glicerol y combinaciones de los mismos. Una fuente de carbono especialmente preferida es glucosa. Otra fuente de carbono preferida es sacarosa.

45 En una forma de realización particular de la invención, la fuente de carbono deriva de una fuente de alimentación renovable. Fuente de alimentación renovable se define como una materia prima necesaria para llevar adelante ciertos procesos industriales que puede regenerarse en poco tiempo y en una cantidad suficiente que permita su transformación en el producto deseado. La biomasa vegetal, tratada o no, es una fuente de carbono renovable  
50 interesante.

La fuente de carbono es fermentable, lo cual significa que puede ser usada para el crecimiento de microorganismos.

55 La expresión "fuente de azufre" de acuerdo con la invención se refiere a sulfato, tiosulfato, sulfuro de hidrógeno, ditionato, ditionito, sulfito, metilmercaptano, dimetilsulfuro y otros sulfuros con capucha de metilo o una combinación de las distintas fuentes. Más preferentemente, la fuente de azufre en el medio de cultivo es sulfato o tiosulfato o una mezcla de los mismos.

60 El cultivo puede desarrollarse en condiciones tales que el microorganismo sufra una limitación o falta de sustrato inorgánico, en particular fosfato y/o potasio. La operación de someter un organismo a una limitación de sustrato inorgánico define una condición en la que el crecimiento de los microorganismos está condicionado por la cantidad de producto químico inorgánico que se suministra que permite aun así un crecimiento atenuado. El hecho de que un microorganismo sufra la falta de un sustrato inorgánico define la condición en la que el crecimiento del microorganismo se detiene completamente debido a la ausencia del sustrato inorgánico.

La expresión "fuente de nitrógeno" corresponde a una sal de amonio o gas de amoníaco. El nitrógeno proviene de una fuente inorgánica (por ejemplo,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) u orgánica (por ejemplo, urea o glutamato). En la invención, las fuentes de nitrógeno en el cultivo son  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

5 El microorganismo recombinante se cultiva en condiciones de limitación de nitrógeno. De hecho, los inventores de la presente han observado que las condiciones de limitación de nitrógeno promueven la producción de hidroximetionina.

10 La expresión "condiciones de limitación de nitrógeno" se refiere a un medio de cultivo que tiene una concentración limitada de nitrógeno, donde el nitrógeno puede provenir de una fuente inorgánica (por ejemplo,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) u orgánica (por ejemplo, urea o glutamato), y la expresión "condiciones de falta de nitrógeno" se refiere a un medio que no contiene ninguna fuente de nitrógeno.

15 "Limitación de nitrógeno" significa que la fuente de nitrógeno disponible está presente en una cantidad tal que la tasa de crecimiento y/o rendimiento en biomasa de la bacteria está limitada, lo que significa que la fuente de nitrógeno está presente en una cantidad por debajo de la cantidad necesaria para asegurar el máximo de tasa de crecimiento y/o rendimiento en biomasa. Una persona experta en la técnica podrá determinar una concentración limitada apropiada de nitrógeno que resulte la adecuada para inducir la producción de hidroximetionina. La "cantidad de nitrógeno limitante" real puede variar según el medio en particular y la cepa de microorganismo que se hayan usado.  
 20 Por ejemplo, el microorganismo es una bacteria recombinante productora de metionina e hidroximetionina con una elevada necesidad de nitrógeno. La cantidad de nitrógeno que se aplique en el medio depende de estas características. Puede ser determinada por experimentación común con la bacteria en medio de cultivo con distintas concentraciones de la fuente de nitrógeno. Por otra parte, la persona experta en la técnica conoce procedimientos, como la cromatografía iónica, para medir la concentración de nitrógeno disponible en el medio durante la fermentación y, por lo tanto, la concentración de nitrógeno residual que determine las condiciones de la limitación.

25 Se sabe que el crecimiento de una cepa no modificada de *E. coli* en condiciones normales requiere una proporción de C/N (mol/mol) de aproximadamente 4,2 (Energetics and kinetics in biotechnology. J.A. Roels. Elsevier Science & Technology (Mayo de 1983)).

30 En una forma de realización específica de la invención, la fermentación se lleva a cabo en condiciones generales en las que los distintos medios utilizados en el cultivo dan lugar a una proporción molar de C/N superior a aproximadamente 5, preferentemente superior a aproximadamente 10, más preferentemente superior a aproximadamente 20 y mucho más preferentemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25 (donde la proporción de C/N se mide como la proporción molar entre carbono elemental y nitrógeno elemental en las respectivas fuentes de carbohidratos y nitrógeno).

35 En una forma de realización preferida de la invención, el proceso de producción comprende tres etapas sucesivas con el mismo microorganismo en el mismo medio de cultivo por lotes:

- 40
- hacer crecer un microorganismo recombinante en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono fermentable, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno,
  - 45 - cultivar el microorganismo recombinante en condiciones de limitación de nitrógeno en dicho medio de cultivo apropiado,
  - recuperar la hidroximetionina del medio de cultivo.

50 La fermentación se realiza en el mismo medio de cultivo por lotes original durante todo el proceso en el que las condiciones de cultivo evolucionan según el desempeño del microorganismo y la composición del medio de alimentación por lotes introducidos durante el cultivo.

55 La etapa de 'crecimiento' se realiza en condiciones de medio mínimo sin limitación en las que comienza la producción de metionina. La etapa de 'cultivo', donde se incrementa la producción de hidroximetionina, se lleva a cabo en condiciones de limitación de nitrógeno.

60 La limitación de nitrógeno ocurre cuando el microorganismo ha consumido casi todo el nitrógeno que se encuentra en el medio de cultivo para su división y producción. Cuanto más crece el microorganismo y más metionina produce, mayor es la cantidad de nitrógeno que utiliza. Por esta razón, las condiciones de limitación de nitrógeno dependen de las características del microorganismo y más precisamente, de su tasa de crecimiento y producción. La persona experta en la técnica está en condiciones de calcular y prever las necesidades específicas de un microorganismo recombinante.

65 En una forma de realización específica de la invención, el microorganismo recombinante se cultiva en un sistema de biorreactor en dos etapas sucesivas:

- a. Crecimiento de los microorganismos durante aproximadamente 10 h a 20 h en un medio de cultivo apropiado, que comprende una fuente de carbono fermentable, una fuente de azufre y nitrógeno, preferentemente durante aproximadamente 15 h a 20 h,
- 5 b. Cultivo de los microorganismos durante aproximadamente 10 h a 20 h en condiciones de limitación de nitrógeno en dicho medio de cultivo apropiado, preferentemente durante aproximadamente 10 h a 15 h.

Como ha sido descrito previamente, el microorganismo recombinante utilizado en el proceso de acuerdo con la invención está modificado genéticamente para convertir la fuente de carbono en metionina e hidroximetionina.

10

- **Modificaciones genéticas**

En la descripción de la presente invención, los genes y las proteínas están identificados utilizando las denominaciones de los genes correspondientes en *E. coli*. Sin embargo, y a menos que se especifique otra cosa, la utilización de estas denominaciones tiene un significado más general de acuerdo con la invención y cubren a todos los genes y proteínas correspondientes en otros organismos, más particularmente microorganismos.

15

La PFAM (base de datos con alineamientos y modelos ocultos de Markov de familias de proteínas; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) representa una gran colección de alineamientos de secuencias de proteínas. Cada PFAM permite visualizar alineamientos múltiples, ver dominios de proteína, evaluar la distribución entre los organismos, acceder a otras bases de datos, y visualizar estructuras conocidas de proteínas.

20

Los COG (agrupamientos de grupos de proteínas ortólogos; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen comparando secuencias de proteínas de 66 genomas totalmente secuenciados que representan 38 líneas filogénicas principales. Cada COG se define a partir de por lo menos tres líneas, lo cual permite la identificación de dominios antes conservados.

25

Los expertos en la técnica conocen bien los medios para identificar secuencias homólogas y el porcentaje de sus homología, e incluyen en particular los programas BLAST, de los cuales se puede disponer a través del sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros por defecto indicados en dicho sitio web. Las secuencias obtenidas pueden explotarse (por ejemplo, alinearse) por medio, por ejemplo, los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) o MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), con los parámetros por defecto indicados en dichos sitios web.

30

Utilizando las referencias proporcionadas en GenBank para dichos genes, los expertos en la técnica pueden determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Esta tarea de rutina se realiza ventajosamente usando secuencias de consenso que pueden ser determinadas realizando los alineamientos de secuencia con genes derivados de otros microorganismos, y diseñando sondas degeneradas para clonar el gen correspondiente en otro organismo. Estos procedimientos habituales de la biología molecular son bien conocidos por los expertos en la técnica y están reivindicados, por ejemplo, por Sambrook *et al.* (1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2.<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Nueva York.).

35

La expresión "atenuación de la actividad" de acuerdo con la invención podría ser aplicada a una enzima o un gen e indica, en cada caso, la supresión parcial o completa de la expresión del gen correspondiente, que entonces pasa a llamarse "atenuado". Esta supresión de la expresión puede ser una inhibición de la expresión del gen, una delección de toda la región promotora, o parte de ella, necesaria para la expresión génica, una delección de la región codificante del gen, o el intercambio del promotor de origen salvaje por un promotor natural o sintético más débil. Preferentemente, la atenuación de un gen consiste esencialmente en la delección completa de dicho gen, que puede ser reemplazado por un gen marcador de selección que facilita la identificación, el aislamiento y la purificación de las cepas de acuerdo con la invención. La inactivación de un gen se consigue preferentemente mediante la técnica de recombinación homóloga (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645).

45

La expresión "actividad incrementada" designa una actividad enzimática que es superior a la actividad enzimática del microorganismo no modificado. La persona experta en la técnica sabe cómo medir la actividad enzimática de dicha enzima.

50

Para incrementar una actividad enzimática, la persona experta en la técnica conoce distintos medios: modificar el sitio catalítico de la proteína, aumentar la estabilidad de la proteína, aumentar la estabilidad del ARN mensajero, aumentar la expresión del gen que codifica la proteína.

55

En la técnica son conocidos los elementos que estabilizan las proteínas (por ejemplo las etiquetas GST, Amersham Biosciences), así como los elementos que estabilizan el ARN mensajero (Carrier y Keasling (1998) Biotechnol. Prog. 15, 58-64).

60

65

Las expresiones “aumento de la expresión del gen”, “expresión incrementada del gen” o “sobrexpresión del gen” se usan indistintamente en el texto de esta memoria descriptiva y tienen un significado similar.

5 Para aumentar la expresión de un gen, la persona experta en la técnica conoce diferentes técnicas: aumentar el número de copias del gen en el microorganismo, por medio de un promotor que induce un elevado nivel de expresión del gen, atenuar la actividad y/o la expresión de un represor directo o indirecto de la transcripción del gen.

10 El gen está codificado cromosómicamente o extracromosómicamente. Cuando el gen se ubica en el cromosoma, se pueden introducir varias copias del gen en el cromosoma a través de procedimientos de recombinación que la persona experta en el campo conoce (incluido el reemplazo génico). Cuando el gen se ubica extracromosómicamente, el gen es llevado por diferentes tipos de plásmidos que se distinguen por su origen de replicación y, por tanto, su número de copias en la célula. Estos plásmidos se encuentran en el microorganismo en 1 a 5 copias, o aproximadamente 20 copias, o hasta 500 copias, dependiendo de la naturaleza del plásmido: plásmidos de bajo número de copias con replicación muy ajustada (pSC101, RK2), plásmidos de bajo número de copias (pACYC, pRSF1010) o plásmidos de alto número de copias (pSK bluescript II).

20 En una forma de realización específica de la invención, el gen se expresa usando promotores con diferente fortaleza. En una forma de realización de la invención, los promotores son inducibles. Estos promotores son homólogos o heterólogos. La persona experta en la técnica sabe qué promotores son los más convenientes, por ejemplo los promotores *P<sub>trc</sub>*, *P<sub>tac</sub>*, *P<sub>lac</sub>* o el promotor de lambda *cI* son ampliamente utilizados.

- **Optimización de la ruta de biosíntesis de metionina:**

25 Los genes involucrados en la producción de metionina en un microorganismo son desde ya conocidos en la técnica, y comprenden genes involucrados en la ruta de biosíntesis específica de metionina al igual que genes involucrados en las rutas que proveen precursores y genes involucrados en las rutas que consumen metionina.

30 La producción eficiente de metionina requiere la optimización de la ruta específica de la metionina y varias rutas que proveen precursores. Las cepas que producen metionina han sido descritas en las solicitudes de patente WO2005/111202, WO2007/077041 y WO2009/043803.

35 La solicitud de patente WO2005/111202 describe una cepa productora de metionina que sobreexpresa alelos de homoserina succiniltransferasa con sensibilidad reducida a retroalimentación de sus inhibidores SAM y metionina (llamada *metA\**). Esta solicitud de patente describe asimismo la combinación de estos alelos con una delección del represor de metionina *MetJ* responsable de la regulación a la baja del regulón de metionina. Por otra parte, la solicitud de patente describe combinaciones de las dos modificaciones con la sobreexpresión de aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa (codificadas por el gen *thrA*).

40 Para mejorar la producción de metionina, el microorganismo puede exhibir:

- una expresión aumentada de por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo formado por:
  - 45 • *cysP* que codifica para una proteína periplásmica de unión a sulfato, como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803,
  - *cysU* que codifica para un componente de transportador de sulfato ABC, como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803,
  - 50 • *cysW* que codifica para una proteína de transporte de sulfato unida a membrana, como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803,
  - *cysA* que codifica para una sulfato permeasa, como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803,
  - 55 • *cysM* que codifica para una O-acetil serina sulfhidralasa, como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803,
  - 60 • *cysI* y *cysJ* que codifican respectivamente para las subunidades alfa y beta de una sulfito reductasa como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803. Preferentemente *cysI* y *cysJ* se sobreexpresan juntos,
  - *cysH* que codifica para una adenililsulfato reductasa, como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803,
  - 65 • *cysE* que codifica para una serina aciltransferasa, como está descrito en WO2007/077041,

- *serA* que codifica para una fosfoglicerato deshidrogenasa, como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803,
- 5 • *serB* que codifica para una fosfoserina fosfatasa, como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803,
- *serC* que codifica para una fosfoserina aminotransferasa, como está descrito en WO2007/077041 y en  
10 WO2009/043803,
- alelos de *metA* que codifican para homoserina succiniltransferasas con sensibilidad reducida a retroalimentación de la S-adenosilmetionina y/o metionina (*metA\**) como está descrito en WO2005/111202,
- 15 • alelos de *thrA* o *thrA* que codifican aspartoquinasas/homoserina deshidrogenasa con inhibición por retroalimentación de la treonina (*thrA\**), como está descrito en WO2009/043803 y WO2005/111202,
- o una inhibición de la expresión de por lo menos uno de los siguientes genes:
- 20 • *pykA* que codifica para una piruvato quinasa, como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803,
- *pykF* que codifica para una piruvato quinasa, como está descrito en WO2007/077041 y en  
25 WO2009/043803,
- *purU* que codifica para una formiltetrahidrofolato desformilasa, como está descrito en WO2007/077041 y en WO2009/043803,
- *yncA* que codifica para una N-acetiltransferasa, como está descrito en WO 2010/020681,
- 30 • *metJ* que codifica para un represor de la ruta de la biosíntesis de metionina, como está descrito en WO2005/111202,
- *ybdL* que codifica para una aminotransferasa.
- 35 - o un incremento del metabolismo C1 que da lugar a un aumento de la producción de metionina.

40 De acuerdo con la invención, “aumentar el metabolismo C1” se refiere al aumento de la actividad de por lo menos una enzima involucrada en el metabolismo C1 escogida entre MetF, GcvTHP, Lpd, GlyA, MetE o MetH. Para incrementar la actividad de la enzima, los genes correspondientes a estas diferentes enzimas pueden estar sobreexpresados o modificados en su secuencia nucleica para expresar enzima con actividad aumentada o se puede disminuir su sensibilidad a la regulación por retroalimentación.

45 En una forma de realización preferida de la invención, el metabolismo C1 aumenta al aumentar la actividad de la metilentetrahidrofolato reductasa MetF y/o la actividad del complejo de escisión de la glicina GcvTHP y/o la actividad de serina hidroximetiltransferasa GlyA.

50 En una forma de realización específica de la invención, la actividad de MetF se aumenta mediante la sobreexpresión del gen *metF* y/o al optimizarse la translación.

55 En una forma de realización específica de la invención, la sobreexpresión del gen *metF* se consigue expresando el gen bajo el control de un promotor fuerte que pertenece a los promotores de la familia de *P<sub>trc</sub>*, o bajo el control de un promotor inducible, tal como un promotor inducible por temperatura P<sub>R</sub> como está descrito en la solicitud de patente PCT/FR2009/052520.

De acuerdo con otra forma de realización de la invención, la optimización de la traducción de la proteína MetF se consigue empleando un estabilizador de ARN. La persona experta en el campo conoce otros medios para la lograr la sobreexpresión de un gen y se los puede utilizar para lograr la superexpresión del gen *metF*.

60 En una forma de realización específica de la invención, los genes pueden estar bajo el control de un promotor inducible. La solicitud de patente PCT/FR2009/052520 describe una cepa productora de metionina que expresa un alelo *thrA* con inhibición por retroalimentación de treonina reducida y *cysE* bajo el control de un promotor inducible.

En una forma de realización preferida de la invención, el gen o alelo *thrA* está controlado por un promotor inducible por temperatura. En una forma de realización más preferida, se emplea un promotor inducible por temperatura que pertenece a la familia de los promotores P<sub>R</sub>.

5 En otro aspecto de la invención, se aumenta la actividad de la piruvato carboxilasa. Aumentar la actividad de la piruvato carboxilasa es algo que se obtiene sobreexpresando el gen correspondiente o modificando la secuencia nucleica de este gen para expresar una enzima con actividad mejorada. En otra forma de realización de la invención, el gen *pyc* es introducido en el cromosoma en una o varias copias por recombinación o llevado por un plásmido que está presente en por lo menos una copia en el microorganismo modificado. El gen *pyc* proviene de *Rhizobium etli*,  
 10 *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Lactococcus lactis* o *Corynebacterium* species.

Otras modificaciones genéticas con las que se consigue mejorar la producción de metionina consisten en aumentar la expresión de *pntAB* y/o atenuar *udhA* tal como se describe en las solicitudes de patente WO-A-2012055798, EP10306164.4 y US61/406249.

15 En una forma de realización particular de la invención, los genes sobreexpresados se encuentran en su posición nativa en el cromosoma o se integran en una posición no nativa. Para lograr una producción óptima de metionina, pueden ser necesarias varias copias del gen, y estas copias múltiples son integradas a los loci específicos, cuya modificación no tiene un impacto negativo en la producción de metionina.

20 Ejemplos de locus en el que se puede integrar un gen sin alterar el metabolismo de la célula son los siguientes:

Locus	Número de acceso	Función
aaaD	87081759	Seudogén, homólogo de la proteína A de terminasa de fago, fragmento N-terminal
aaaE	1787395	Seudogén, homólogo de la proteína A de terminasa de fago, fragmento C-terminal
afuB	1786458	Seudogén, permeasa transportadora de la familia ABC férrica; fragmento C-terminal
afuC	87081709	subunidad férrica del transportador ABC predicha (componente de unión a ATP)
agaA	48994927	Seudogén, fragmento C-terminal, GalNAc-6-P desacetilasa
agaW	1789522	Seudogén, fragmento N-terminal, EIICGalNAc del sistema PTS
alpA	1788977	Proteasa
appY	1786776	Activador de la transcripción de unión a ADN
argF	1786469	ornitina carbamoiltransferasa
argU	ninguno	ARNt de arginina
argW	ninguno	ARNt de arginina(CCU) 5
arpB	87081959	Reconstrucción de seudogén, repeticiones de anquirina
arrD	1786768	lisozima
arrQ	1787836	homólogo de proteína R de lisozima de fago lambda
arsB	87082277	Transportador de arsenito
arsC	1789918	arseniato reductasa
arsR	1789916	represor de la transcripción de la unión al ADN
beeE	1787397	Seudogén, fragmento N-terminal, proteína portal
borD	1786770	homólogo de proteína de bacteriófago lambda Bor
cohE	1787391	represor símil Ci
croE	87081841	represor símil Cro
cspB	1787839	Proteína de choque frío
cspF	1787840	Homólogo de proteína de choque frío
cspl	1787834	Proteína de choque frío
cybC	1790684	Seudogén, fragmento N-terminal, citocromo b562
dicA	1787853	Regulador para dicB

## ES 2 528 495 T3

<b>Locus</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Función</b>
dicB	1787857	Control de la división celular
dicC	1787852	Regulador para dicB
dicF	ninguno	ARNp antisentido de DicF
eaeH	1786488	Seudogén, homólogo de intimina
efeU	87081821	Reconstrucción deseudogén, permeasa de hierro ferroso
emrE	1786755	Bomba de resistencia a fármacos múltiples
essD	1786767	proteína de lisis de fago predicha
essQ	87081934	homólogo de proteína de lisis de fago lambda S
exoD	1786750	Seudogén, fragmento C-terminal de exonucleasa
eyeA	ninguno	nuevo ARNp, función desconocida
flu	48994897	Antígeno 43
fixA	1787849	Desconocida
gapC	87081902	Reconstrucción deseudogén, GAP deshidrogenasa
gatR	87082039	Reconstrucción deseudogén, represor para el operón gat
glvC	1790116	Reconstrucción deseudogén
glvG	1790115	Reconstrucción deseudogén, 6-fosfo-beta-glucosidasa
gnsB	87081932	Supresor multicopia de secG(Cs) y fabA6(Ts)
gtrA	1788691	glucosa translocasa unida a bactoprenol
gtrB	1788692	glucosil transferasa unida a bactoprenol
gtrS	1788693	glucosil transferasa
hokD	1787845	polipéptido tóxico pequeño de membrana
icd	1787381	Isocitrato deshidrogenasa
icdC	87081844	Seudogén
ilvG	87082328	Reconstrucción deseudogén, acetohidroxiácido sintasa II
insA	1786204	Gen IS1, función de transposición
insA	1786204	Gen IS1, función de transposición
insB	1786203	Transposasa de secuencia de inserción de IS1
insB	1786203	Transposasa de secuencia de inserción de IS1
insC	1786557	Gen IS2, función de transposición
insD	1786558	Gen IS2, función de transposición
insD	1786558	Gen IS2, función de transposición
insE	1786489	Gen IS3, función de transposición
insF	1786490	Gen IS3, función de transposición
insH	1786453	Gen IS5, función de transposición
insH	1786453	Gen IS5, función de transposición
insH	1786453	Gen IS5, función de transposición
insI	1786450	Gen IS30, función de transposición
insI(-1)	1786450	Gen IS30, función de transposición
insM	87082409	Seudogén, transposasa IS600 truncada
insN	1786449	Reconstrucción deseudogén, transposasa IS911 ORFAB
insO	ninguno	Reconstrucción deseudogén, transposasa IS911 ORFAB
insX	87081710	Seudogén, transposasa de la familia IS3, fragmento N-terminal

## ES 2 528 495 T3

<b>Locus</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Función</b>
insZ	1787491	Reconstrucción de seudogén, familia de transposasas IS4, en ISZ'
intA	1788974	Gen de integrasa
intB	1790722	Reconstrucción de seudogén, integrasa símil P4
intD	1786748	integrasa predicha
intE	1787386	Integrasa e14
intF	2367104	Integrasa de fago predicha
intG	1788246	Seudogén, homólogo de integrasa
intK	1787850	Seudogén, fragmento de integrasa
intQ	1787861	Seudogén, fragmento de integrasa
intR	1787607	Gen de integrasa
intS	1788690	Integrasa
intZ	1788783	Gen putativo de integrasa
isrC	ninguno	Nuevo ARNp, función desconocida
jayE	87081842	Seudogén, fragmento C-terminal, placa base
kilR	87081884	Función asesina del profago de Rac
lafU	ninguno	Seudogén, fragmento de proteína motora flagelar lateral
lfhA	87081703	Seudogén, fragmento de proteína de ensamblado flagelar lateral
lit	1787385	Peptidasa de muerte celular
lomR	1787632	Reconstrucción de seudogén, homólogo de lom; proteína de membrana externa interrumpida por IS5Y, extremo N-terminal faltante
malS	1789995	$\alpha$ -amilasa
mcrA	1787406	proteína de unión a ADN específica de 5-metilcitosina
mdtQ	87082057	Reconstrucción de seudogén, bomba de fármacos lipoproteínica familia OMF
melB	1790561	melibiosa permeasa
mmuM	1786456	homocisteína metiltransferasa
mmuP	870811708	S-metilmetionina permeasa
mokA	ninguno	Seudogén, péptido regulador de superposición, habilita a hokB
ninE	1786760	Desconocida
nmpC	1786765	Reconstrucción de seudogén, OM porina, interrumpida por IS5B
nohD	1786773	Proteína empaquetadora de ADN
nohQ	1787830	Seudogén, homólogo de fago lambda Nu1, familia de subunidades pequeñas de terminasa, proteína empaquetadora de ADN putativa
ogrK	1788398	Regulador positivo del crecimiento de P2
ompT	1786777	proteasa VII de membrana externa
oweE	ninguno	Seudogén, homólogo de proteína O de replicación de lambda
oweS	1788700	Seudogén, homólogo de proteína O de replicación de lambda
pauD	ninguno	Seudogén argU, sitio de unión al profago DLP12
pawZ	ninguno	Sitio de unión al profago CPS-53 attR, seudogén argW
pbl	87082169	Reconstrucción de seudogén, homólogo de pilT
peaD	87081754	Seudogén, familia de proteína P de replicación de fago lambda; fragmento C-terminal
perR	1786448	regulador de la transcripción de unión a ADN predicho
pgaA	1787261	porina de membrana externa de la ruta de biosíntesis de poli- $\beta$ -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA)

## ES 2 528 495 T3

<b>Locus</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Función</b>
pgaB	1787260	PGA N-desacetilasa
pgaC	1787259	UDP-N-acetil-D-glucosamina $\beta$ -1,6-N-acetil-D-glucosaminil transferasa
pgaD	1787258	proteína de membrana interna predicha
phnE	87082370	Reconstrucción de seudogén, fosfonato permeasa
pinE	1787404	ADN Invertasa
pinH	1789002	Seudogén, ADN invertasa, recombinación de sitio específico
pinQ	1787827	ADN invertasa
pinR	1787638	ADN invertasa
prfH	1786431	Seudogén, homólogo del factor de liberación de proteínas
psaA	ninguno	Seudogén ssrA, duplicación del sitio de unión de CP4-57
ptwF	ninguno	Seudogén thrW, sitio de unión al profago CP4-6
quuD	1786763	proteína de antiterminación predicha
quuQ	87081935	homólogo de proteína de antiterminación lambda Q
racC	1787614	Desconocida
racR	1787619	Represor del profago Rac, símil cl
ralR	1787610	Gen paliativo de la restricción
rbsA	1790190	subunidad del transportador ABC de D-ribosa (Componente de unión a ATP)
rbsD	87082327	D-ribosa piranasa
recE	1787612	RecET recombinasa
recT	1787611	RecET recombinasa
relB	1787847	Antitoxina para RelE
relE	1787846	Endorribonucleasa de ARNm de secuencia específica
rem	1787844	Desconocida
renD	87081755	Reconstrucción de seudogén, homólogo de lambda ren, interrumpida por IS3C; activador putativo de la transcripción de lit
rhsE	1787728	Seudogén, familia rhs, codificada dentro de la repetición RhsE
rnlA	1788983	RNasa LS, endorribonucleasa
rph	1790074	Reconstrucción de seudogén, RNasa PH
rusA	1786762	Endonucleasa
rzoD	87081757	Probable lipoproteína símil Rz1
rzoQ	ninguno	Probable lipoproteína símil Rz1
rzoR	87081890	Probable lipoproteína símil Rz1
rzpD	1786769	mureína endopeptidasa predicha
rzpQ	1787835	equivalente símil Rz
rzpR	87081889	Seudogén, homólogo de Rz
sieB	87081885	proteína de exclusión de superinfección
sokA	ninguno	Seudogén, ARNp antisentido que bloquea la traducción mokA/hokA
stfE	87081843	casete variable C-terminal de Stf, proteína de especificidad alternativo del huésped virión; dominio "Tail Collar", seudogén
stfP	1787400	proteína de fibras de cola predicha
stfR	87081892	proteína de fibras de cola lateral
tfaD	87081759	Seudogén, gen de ensamble de fibras de cola, fragmento C-terminal

ES 2 528 495 T3

<b>Locus</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Función</b>
tfaE	1787402	Gen de ensamble de fibras de cola predicho
tfaP	1787401	Gen de ensamble de fibras de cola predicho
tfaQ	2367120	Homólogo del gen de ensamble de fibras de cola de fago lambda
tfaR	1787637	Homólogo del gen de ensamble de fibras de cola de fago lambda
tfaS	87082088	Seudogén, gen de ensamble de fibras de cola, fragmento C-terminal
tfaX	2367110	Reconstrucción deseudogén, gen de ensamble de fibras de cola, fragmento C-terminal
thrW	ninguno	ARNt de treonina (sitio de unión del profago CP4-6)
torI	87082092	Excisionasa de CPS-53/KpLE1
treB	2367362	subunidad de trehalosa PTS permeasa (dominios IIB/IIC)
treC	1790687	Trehalosa-6-fosfato hidrolasa
trkG	1787626	Permeasa de reabsorción de K <sup>+</sup> constitutiva principal
ttcA	1787607	Gen de integrasa
ttcC	ninguno	Seudogén, duplicación del sitio de integración ttcA del profago Rac
uidB	1787902	Glucurónido permeasa, mutante puntual inactivo
uxaA	1789475	altronato hidrolasa
uxaC	2367192	uronato isomerasa
wbbL	1788343	Reconstrucción deseudogén, ramnosil transferasa
wcaM	1788356	proteína predicha de biosíntesis del ácido colánico
xisD	ninguno	Seudogén, fragmento de excisionasa en profago DLP12 defectuoso
xisE	1787387	e14 excisionasa
yabP	1786242	Reconstrucción deseudogén
yafF	87081701	Seudogén, fragmento C-terminal, proteína asociada a repeticiones H
yafU	1786411	Seudogén, fragmento C-terminal
yafW	1786440	antitoxina del sistema toxina-antitoxina Ykfl-YafW
yafX	1786442	Desconocida
yafY	1786445	regulador de la transcripción de unión a ADN; lipoproteína de membrana interna predicho
yafZ	87081705	Desconocida
yagA	1786462	regulador de la transcripción de unión a ADN predicho
yagB	87081711	Seudogén, relacionado con antitoxina, fragmento N-terminal
yagE	1786463	liasa/sintasa predicha
yagF	1786464	deshidratasa predicha
yagG	1786466	simportador de azúcar putativo
yagH	1786467	$\beta$ -xilosidasa putativa
yagI	1786468	regulador de la transcripción de unión a ADN predicho
yagJ	1786472	Desconocida
yagK	1786473	Desconocida
yagL	1786474	Proteína de unión a ADN
yagM	2367101	Desconocida
yagN	2367102	Desconocida
yagP	1786476	Seudogén, familia LysR, fragmento
yaiT	1786569	Reconstrucción deseudogén, familia de autotransportadores

## ES 2 528 495 T3

<b>Locus</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Función</b>
yaiX	87082443	Reconstrucción de seudogén, interrumpida por IS2A
ybbD	1786709	Reconstrucción de seudogén, nueva familia conservada
ybcK	1786756	Recombinasa predicha
ybcL	1786757	inhibidor de quinasas predicho
ybcM	1786758	regulador de la transcripción de unión a ADN predicho
ybcN	1786759	proteína flip de base de ADN
ybcO	1786761	Desconocida
ybcV	87081758	Desconocida
ybcW	1786772	Desconocida
ybcY	48994878	Reconstrucción de seudogén, familia de metiltransferasas
ybeM	1786843	Reconstrucción de seudogén, CN hidrolasa putativa
ybfG	87081771	Reconstrucción de seudogén, nueva familia conservada
ybfl	ninguno	Reconstrucción de seudogén, homólogo de KdpE
ybfL	87081775	Reconstrucción de seudogén, proteína asociada a repeticiones H
ybfO	1786921	Seudogén, copia de núcleo de Rhs con extensión única
ycgH	87081847	Reconstrucción de seudogén
ycgI	1787421	Reconstrucción de seudogén, homólogo de autotransportador
ycjV	1787577	Reconstrucción de seudogén, parálogo de malK
ydaC	1787609	Desconocida
ydaE	87081883	Metalotioneína
ydaF	87081886	Desconocida
ydaG	87081887	Desconocida
ydaQ	87081882	Excisionasa putativa
ydaS	1787620	Desconocida
ydaT	1787621	Desconocida
ydaU	1787622	Desconocida
ydaV	1787623	Desconocida
ydaW	87081888	Seudogén, fragmento N-terminal
ydaY	1787629	Seudogén
ydbA	87081898	Reconstrucción de seudogén, homólogo de autotransportador
yddK	1787745	Seudogén, fragmento C-terminal, rico en leucina
yddL	1787746	Seudogén, familia de porinas OmpCFN, fragmento N-terminal
ydeT	1787782	Seudogén, familia FimD, fragmento C-terminal
ydfA	1787854	Desconocida
ydfB	87081937	Desconocida
ydfC	1787856	Desconocida
ydfD	1787858	Desconocida
ydfE	1787859	Seudogén, fragmento N-terminal
ydfJ	1787824	Reconstrucción de seudogén, familia MFS
ydfK	1787826	Gen de choque frío
ydfO	87081931	Desconocida
ydfR	1787837	Desconocida

ES 2 528 495 T3

<b>Locus</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Función</b>
ydfU	87081936	Desconocida
ydfV	1787848	Desconocida
ydfX	1787851	Seudogén
yedN	87082002	Reconstrucción deseudogén, familia IpaH/YopM
yedS	87082009	Reconstrucción deseudogén, homólogo de proteína de membrana externa
yeeH	ninguno	Seudogén, fragmento interno
yeeL	87082016	Reconstrucción deseudogén, familia de glicosiltransferasas
yeeP	87082019	Seudogén, proteína de unión a GTP putativa
yeeR	87082020	Desconocida
yeeS	1788312	Desconocida
yeeT	1788313	Desconocida
yeeU	1788314	Componente antitoxina del par de proteínas toxina–antitoxina YeeV-YeeU
yeeV	1788315	Componente toxina del par de proteínas toxina–antitoxina YeeV-YeeU
yeeW	1788316	seudogén
yegZ	ninguno	Seudogén, proteína D símil fago P2 de gpD; fragmento C-terminal
yehH	87082046	Reconstrucción deseudogén
yehQ	87082050	Reconstrucción deseudogén
yejO	1788516	Reconstrucción deseudogén, homólogo de autotransportador
yfaH	1788571	Reconstrucción deseudogén, fragmento C-terminal, homólogo de LysR
yfaS	87082066	Reconstrucción deseudogén
yfcU	1788678	Reconstrucción deseudogén, familia FimD
yfdK	1788696	Desconocida
yfdL	1788697	Seudogén, proteína de fibras de cola
yfdM	87082089	Seudogén, gen intacto codifica una adenina metiltransferasa de ADN predicha
yfdN	1788699	Desconocida
yfdP	1788701	Desconocida
yfdQ	1788702	Desconocida
yfdR	87082090	Desconocida
yfdS	1788704	Desconocida
yfdT	1788705	Desconocida
yffL	1788784	Desconocida
yffM	1788785	Desconocida
yffN	1788786	Desconocida
yffO	1788787	Desconocida
yffP	1788788	Desconocida
yffQ	1788790	Desconocida
yffR	1788791	Desconocida
yffS	1788792	Desconocida
yfjH	1788976	Desconocida
yfjI	1788978	Desconocida
yfjJ	1788979	Desconocida

ES 2 528 495 T3

<b>Locus</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Función</b>
yfjK	1788980	Desconocida
yfjL	1788981	Desconocida
yfjM	1788982	Desconocida
yfjO	87082140	Desconocida
yfjP	48994902	Desconocida
yfjQ	1788987	Desconocida
yfjR	1788988	Desconocida
yfjS	87082142	Desconocida
yfjT	1788990	Desconocida
yfjU	1788991	Seudogén
yfjV	1788992	Reconstrucción de seudogén, fragmento C-terminal símil arsB
yfjW	2367146	Desconocida
yfjX	1788996	Desconocida
yfjY	1788997	Desconocida
yfjZ	1788998	Componente antitoxina del par putativo toxina–antitoxina YpjF–YfjZ
ygaQ	1789007	Reconstrucción de seudogén, tiene dominio relacionado con alfa–amilasa
ygaY	1789035	Reconstrucción de seudogén, familia MFS
ygeF	2367169	Reconstrucción de seudogén, parte de T3SS PAI ETT2 remanente
ygeK	87082170	Reconstrucción de seudogén, parte de T3SS PAI ETT2 remanente
ygeN	1789221	Reconstrucción de seudogén, homólogo de orgB
ygeO	1789223	Seudogén, homólogo de orgA, parte de T3SS PAI ETT2 remanente
ygeQ	1789226	Reconstrucción de seudogén, parte de T3SS PAI ETT2 remanente
yghE	1789340	Reconstrucción de seudogén, familia de proteínas de secreción general
yghF	1789341	Seudogén, familia proteína de secreción general
yghO	1789354	Seudogén, fragmento C-terminal
yghX	1789373	Reconstrucción de seudogén, familia de peptidasas S9
yhcE	1789611	Reconstrucción de seudogén, interrumpida por IS5R
yhdW	1789668	Reconstrucción de seudogén
yhiL	87082275	Reconstrucción de seudogén, regulada por FliA
yhiS	1789920	Reconstrucción de seudogén, interrumpida por IS5T
yhjQ	1789955	Reconstrucción de seudogén
yibJ	48994952	Reconstrucción de seudogén, familia Rhc
yibS	ninguno	Reconstrucción de seudogén, familia Rhc, fragmento C-terminal
yibU	ninguno	Reconstrucción de seudogén, proteína asociada a repeticiones H
yibW	ninguno	Reconstrucción de seudogén, unida a rhsA
yicT	ninguno	Seudogén, fragmento N-terminal
yifN	2367279	Reconstrucción de seudogén
yjbl	1790471	Reconstrucción de seudogén
yjdQ	ninguno	Reconstrucción de seudogén, integrasa de tipo P4 remanente
yjgX	1790726	Reconstrucción de seudogén, familia EptAB
yjhD	87082406	Seudogén, fragmento C-terminal
yjhE	87082407	Seudogén, transportador putativo remanente

ES 2 528 495 T3

<b>Locus</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Función</b>
yjhR	1790762	Reconstrucción de seudogén, familia de helicasas, fragmento C-terminal
yjhV	1790738	Seudogén, fragmento C-terminal
yjhY	ninguno	Reconstrucción de seudogén, nueva familia dedos de zinc
yjhZ	ninguno	Reconstrucción de seudogén, parálogo de rimK, fragmento C-terminal
yjiP	1790795	Reconstrucción de seudogén, familia de transposasas
yjiT	87082428	Seudogén, fragmento N-terminal
yjiV	ninguno	Reconstrucción de seudogén, tipo helicasa, fragmento C-terminal
yjjN	87082432	Oxidoreductasa predicha
ykfA	87081706	proteína de unión a GTP putativa
ykfB	1786444	Desconocida
ykfC	87081707	Seudogén, familia de transcriptasas reversas del tipo retrón, fragmento N-terminal
ykfF	1786443	Desconocida
ykfG	2367100	Desconocida
ykfH	87081704	Desconocida
ykfI	1786439	toxina del sistema toxina-antitoxina Ykfl-YafW
ykfJ	1786430	Seudogén, fragmento N-terminal
ykfK	1786445	Seudogén, fragmento N-terminal
ykfL	ninguno	Seudogén, fragmento C-terminal
ykfN	ninguno	Seudogén, remanente N-terminal, familia YdiA
ykgA	87081714	Seudogén, fragmento N-terminal, familia AraC
ykgP	ninguno	Seudogén, fragmento de oxidoreductasa
ykgQ	ninguno	Seudogén, fragmento C-terminal de una deshidrogenasa putativa
ykgS	ninguno	fragmento interno de seudogén
ykiA	1786591	Reconstrucción de seudogén, fragmento C-terminal
yIbE	1786730	Reconstrucción de seudogén, parálogo de yahG
yIbG	87081748	Reconstrucción de seudogén, fragmento N-terminal discontinuo
yIbH	1786708	Seudogén, copia de núcleo de Rhs con extensión única
yIbI	ninguno	Seudogén, fragmento interno, familia Rhs
yIcG	87081756	Desconocida
yIcH	ninguno	Desconocida
yIcI	ninguno	Desconocida
ymdE	87081823	Seudogén, fragmento C-terminal
ymfD	1787383	metiltransferasa dependiente de SAM putativa
ymfE	1787384	Desconocida
ymfI	87081839	Desconocida
ymfJ	87081840	Desconocida
ymfL	1787393	Desconocida
ymfM	1787394	Desconocida
ymfQ	1787399	proteína putativa de placa base o de fibras de cola
ymfR	1787396	Desconocida
ymjC	ninguno	Seudogén, fragmento N-terminal

Locus	Número de acceso	Función
ymjD	ninguno	remanente de proteína de fusión a seudogén con delección expresada
ynaA	1787631	Seudogén, fragmento N-terminal
ynaE	1787639	Gen de choque frío
ynaK	1787628	Desconocida
yncl	1787731	Reconstrucción de seudogén, asociada a repeticiones H, unido a RhsE
yncK	ninguno	Reconstrucción de seudogén, homólogo de transposasa
yneL	1787784	Reconstrucción de seudogén, fragmento C-terminal, familia AraC
yneO	1787788	Reconstrucción de seudogén, adhesión putativa de autotransportador de OM
ynfN	87081933	Gen de choque frío
ynfO	ninguno	Desconocida
yoeA	87082018	Reconstrucción de seudogén, interrumpida por IS2F
yoeD	ninguno	Seudogén, fragmento C-terminal de una transposasa putativa
yoeF	87082021	Seudogén, fragmento C-terminal
yoeG	ninguno	seudogén, fragmento N-terminal
yoeH	ninguno	seudogén, fragmento C-terminal
ypdJ	87082091	Seudogén, fragmento de excisionasa
ypjC	1789003	Reconstrucción de seudogén
ypjF	1788999	Componente toxina del par toxina-antitoxina YpjF-YfjZ putativo
ypjI	ninguno	Reconstrucción de seudogén
ypjJ	87082144	Desconocida
ypjK	87082141	Desconocida
yqfE	1789281	Reconstrucción de seudogén, fragmento C-terminal, familia LysR
yqiG	48994919	Reconstrucción de seudogén, familia FimD, interrumpida por IS2I
yrdE	ninguno	Reconstrucción de seudogén, fragmento C-terminal, parálogo de yedZ
yrdF	ninguno	Seudogén, fragmento N-terminal
yrhA	87082266	Reconstrucción de seudogén, interrumpida por IS1E
yrhC	87082273	Reconstrucción de seudogén, fragmento N-terminal
ysaC	ninguno	Seudogén, remanente C-terminal
ysaD	ninguno	Seudogén, remanente de secuencia interna
ytfA	1790650	Seudogén, fragmento C-terminal
yzgL	87082264	Seudogén, proteína periplásmica de unión de solutos putativa

- **Recuperación de hidroximetionina**

5 La acción de “recuperar la hidroximetionina del medio de cultivo” designa la acción de recuperar y purificar hidroximetionina.

En una forma de realización específica de la invención, la hidroximetionina es recuperada del caldo de fermentación (medio de cultivo) por extracción.

10 Esta acción de recuperación podría lograrse mediante extracción líquido-líquido del caldo de fermentación. Preferentemente, el solvente que se usa en esta operación de extracción es sustancialmente inmisible en agua. Los solventes apropiados se eligen entre cetonas tales como la acetona, metiletilcetona, metilamilcetona, metilisoamilcetona, metilisopropilcetona, metilisobutilcetona, etilbutilcetona; éteres como el éter de isopropilo, tetrahidrofurano y dimetoxietano, alcoholes secundarios como el 2-propanol, aldehídos como el n-butiraldehído y ésteres como el acetato de etilo, acetato de n-butilo, acetato de n-propilo y acetato de isopropilo. Los solventes preferidos se escogen entre cetona, éteres y alcoholes secundarios.

15

En otra forma de realización de la invención, la extracción puede ser una combinación de extracción líquido/líquido y extracción sólido/sólido.

5 La hidroximetionina recuperada de la extracción se purifica entonces por destilación, preferentemente destilación de vapores, o por evaporación.

Opcionalmente, se puede retener de 0 a 100%, preferentemente por lo menos 90%, más preferentemente 95%, incluso más preferentemente por lo menos 99%, de la biomasa durante la purificación del producto de fermentación.

10

## Figuras

Figura 1: Concentraciones residuales de amonio para el cultivo de la cepa 1 con las tres soluciones de alimentación por lotes que se usaron para la fermentación.

15

## Ejemplos

### Ejemplo I: Construcción de cepas productoras de metionina e hidroximetionina evaluadas en el Ejemplo II

#### 20 1. Protocolos

Varios protocolos han sido empleados para construir las cepas productoras de metionina e hidroximetionina y están descritos en los siguientes ejemplos.

25 Protocolo 1: Modificaciones cromosómicas por recombinación homóloga y selección de recombinantes (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000)

El reemplazo de alelos o la interrupción génica en loci cromosómicos específicos se llevó a cabo por recombinación homóloga tal cual describen Datsenko & Wanner (2000). Los genes de resistencia al cloranfenicol (Cm) *cat*, de resistencia a la kanamicina (Km) *kan*, o de resistencia a la gentamicina (Gt) *gm*, flanqueados por los sitios de reconocimiento Flp, fueron amplificados por PCR empleando como molde los plásmidos pKD3 o pKD4 o p34S-Gm (Dennis y Zylstra, AEM julio de 1998, pp. 2710-2715) respectivamente. El producto resultante de PCR fue usado para transformar la cepa de *E. coli* receptora que albergaba el plásmido pKD46 que expresaba la  $\lambda$  Red ( $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\text{exo}$ ) recombinasa. Luego se seleccionaron los transformantes resistentes a antibióticos y se verificó la estructura cromosómica de los *loci* mutados mediante análisis de PCR con los cebadores apropiados.

35

#### Protocolo 2: Transducción de fago P1

Las modificaciones cromosómicas fueron transferidas a una determinada cepa de *E. coli* receptora por transducción de P1. El protocolo está compuesto por 2 etapas: (i) preparación del lisado de fago sobre una cepa donante que contiene la modificación cromosómica asociada a la resistencia y (ii) infección de la cepa receptora con este lisado de fago.

40

#### Preparación del lisado de fago

45

- Se inoculan 100  $\mu$ l de un cultivo de una noche de la cepa MG1655 con la modificación cromosómica de interés en 10 ml de LB + 50  $\mu$ g/ml de Km + glucosa 0,2% + CaCl<sub>2</sub> 5 mM (con el antibiótico correspondiente al casete de resistencia de la construcción).

50

- Se incuba durante 30 min a 37°C con agitación.

- Se agregan 100  $\mu$ l de lisado de fago P1 preparado sobre la cepa donante MG1655 (aprox.  $1 \times 10^9$  fago/ml).

- Se agita a 37°C durante 3 horas hasta la lisis completa de las células.

55

- Se agregan 200  $\mu$ l de cloroformo y se agita con el vórtex.

- Se centrifuga durante 10 min a 4500 g para eliminar los restos celulares.

60

- Se transfiere el sobrenadante a un tubo estéril.

- Se almacena el lisado a 4°C.

#### Transducción

65

- Se centrifugan durante 10 min a 1500 g, 5 ml de un cultivo de una noche de la cepa de *E. coli* receptora cultivada en medio LB.
- Se suspende el pellet celular en 2,5 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
- Se infectan 100 µl de células con 100 µl de lisado de fago P1 de cepa MG1655 con la modificación en el cromosoma (tubo de ensayo) y como tubos de control, 100 µl de células sin lisado de fago P1 y 100 µl de lisado de fago P1 sin células.
- Se incuban durante 30 min a 30°C sin agitación.
- Se agregan 100 µl de citrato de sodio 1 M en cada tubo y se agita con el vórtex.
- Se agrega 1 ml de LB.
- Se incuba durante 1 hora a 37°C con agitación.
- Se centrifuga durante 3 min a 7000 r.p.m.
- Se siembra en placa de LB + 50 µg/ml de Km (o el antibiótico correspondiente al casete de resistencia)
- Se incuba a 37°C durante 1 noche.

Tabla 1: Genotipo y número correspondiente de las cepas productoras que se muestran en los siguientes ejemplos.

Número de cepa	Genotipo
1	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>P</i> <i>trc</i> - <i>metH</i> <i>P</i> <i>trcF</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>P</i> <i>trcF</i> - <i>cysJIH</i> <i>P</i> <i>trc09</i> - <i>gcvTHP</i> <i>P</i> <i>trc36</i> - <i>ARNmst17</i> - <i>metF</i> <i>P</i> <i>trc07</i> - <i>serB</i> $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>pykA</i> $\Delta$ <i>purU</i> $\Delta$ <i>yncA</i> $\Delta$ <i>malS</i> :: <i>TTadC</i> - <i>CI857</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> $\Delta$ <i>pgaABCD</i> :: <i>TT02</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>uxaCA</i> :: <i>TT07</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>CP4-6</i> :: <i>TT02</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>wcaM</i> :: <i>TT02</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 <i>DtreBC</i> :: <i>TT02</i> - <i>serA</i> - <i>serC</i> <i>pJB137</i> - <i>PgapA</i> - <i>pycRe</i>
2	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>P</i> <i>trc</i> - <i>metH</i> <i>P</i> <i>trcF</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>P</i> <i>trcF</i> - <i>cysJIH</i> <i>P</i> <i>trc09</i> - <i>gcvTHP</i> <i>P</i> <i>trc36</i> - <i>metF</i> <i>P</i> <i>trc07</i> - <i>serB</i> $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>pykA</i> $\Delta$ <i>purU</i> $\Delta$ <i>yncA</i> $\Delta$ <i>malS</i> :: <i>TTadC</i> - <i>CI857</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> $\Delta$ <i>pgaABCD</i> :: <i>TT02</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>uxaCA</i> :: <i>TT07</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>CP4-6</i> :: <i>TT02</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>wcaM</i> :: <i>TT02</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 <i>DtreBC</i> :: <i>TT02</i> - <i>serA</i> - <i>serC</i> :: <i>Gt</i> <i>P</i> <i>trc01</i> - <i>pntAB</i> :: <i>Cm</i> <i>DudhA</i> :: <i>Km</i>
3	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>P</i> <i>trc</i> - <i>metH</i> <i>P</i> <i>trcF</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>P</i> <i>trcF</i> - <i>cysJIH</i> <i>P</i> <i>trc09</i> - <i>gcvTHP</i> <i>P</i> <i>trc36</i> - <i>ARNmst17</i> - <i>metF</i> <i>P</i> <i>trc07</i> - <i>serB</i> $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>pykA</i> $\Delta$ <i>purU</i> $\Delta$ <i>yncA</i> $\Delta$ <i>malS</i> :: <i>TTadC</i> - <i>CI857</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> $\Delta$ <i>pgaABCD</i> :: <i>TT02</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>uxaCA</i> :: <i>TT07</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>CP4-6</i> :: <i>TT02</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>wcaM</i> :: <i>TT02</i> - <i>TTadC</i> - <i>PlambdaR</i> *(-35)- <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 <i>DtreBC</i> :: <i>TT02</i> - <i>serA</i> - <i>serC</i> <i>DybdL</i> :: <i>Km</i> <i>pCL1920</i> - <i>PgapA</i> - <i>pycRe</i> - <i>TT07</i>

## 2. Construcción de la cepa 1

Para sobreexpresar el gen de piruvato carboxilasa de *Rhizobium etli*, se construyó el plásmido *pJB137-PgapA-pycRe*, que deriva de *pBluescript-SK* (*Alting-Mees et al*, *Nucleic Acids Res.* 17 (22), 9494 (1989) y del plásmido *pJB137* (*Blatny et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 370-379, 1997).

Para construir el inserto *PgapA-pycRe*, se construyeron dos plásmidos; *pSK-PgapA* y *pSK-PgapA-pycRe*.

Primero se amplificaron por PCR el promotor *gapA* y su secuencia RBS a partir de ADN genómico de *E. coli* MG1655 empleando los cebadores Ome 0053-*gapA* F (SEC ID nº: 1) y Ome 0054-*gapA* R (SEC ID nº: 2). El producto resultante de la PCR fue digerido por *HindIII* y clonado entre los sitios *HindIII* del plásmido *pSK*. Se verificó el plásmido obtenido por secuenciación de ADN y se llamó *pSK-PgapA*.

En segundo lugar, se amplificó el gen *pycRe* a partir de ADN genómico de *Rhizobium etli* CFN 42 empleando los cebadores Ome 0057-*PycR* (SEC ID nº: 3) y Ome058-*PycF* (SEC ID nº: 4). El producto resultante de la PCR fue digerido por las enzimas de restricción de *SmaI* y *NdeI* y clonado entre los sitios *SmaI* y *NdeI* del plásmido *pSK-PgapA*. Se verificó el plásmido obtenido por secuenciación de ADN y se llamó *pSK-PgapA-pycRe*.

Por último, el pSK-PgapA-*pycRe* fue digerido por las enzimas de restricción de *SmaI* y *PsiI* y el fragmento digerido *PgapA-pycRe* resultante fue clonado entre los sitios *SmaI* del plásmido pJB137. Se verificó el plásmido obtenido por secuenciación de ADN y se llamó pJB137-PgapA-*pycRe*.

5 Ome 0053-gapA F (SEC ID nº: 1)

ACGTAAGCTTCGTTTAAACAAGCCCAAAGGAAGAGTGAGGC

con

- 10
- secuencia en letra mayúscula subrayada para los sitios de restricción de *HindIII* y *PmeI* y bases extras.
  - secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia del promotor *gapA* (1860640-1860661, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

15 Ome 0054-gapA R (SEC ID nº: 2)

ACGTAAGCTTACCGGTCACGTGTCATATGTTCCACCAGCTATTTGTTAG

20 con

- secuencia en letra mayúscula subrayada para los sitios de restricción de *HindIII*, *AgeI*, *AflIII* y *NdeI* y bases extras.
- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia del promotor *gapA* (1860772-1860791, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

30 Ome 0057-PycR (SEC ID nº: 3)

ACGTCCCGGGCAAGGACGGGCGAACGAAACC

con

- 35
- secuencia en letra mayúscula subrayada para el sitio de restricción de *SmaI* y bases extras.
  - secuencia en letra mayúscula homóloga al gen de piruvato carboxilasa de *Rhizobium etli* (*pycRe*), (4240368-4240388, secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

40 Ome 0058-PycF (SEC ID nº: 4)

ACGTACGTAGCATATGCCCATATCCAAGATACTC

con

- 45
- secuencia en letra mayúscula subrayada para los sitios de restricción de *SnaBI*, *NdeI* y bases extras.
  - secuencia en letra mayúscula homóloga al gen de piruvato carboxilasa de *Rhizobium etli* (*pycRe*), excepto porque el codón de inicio GTG del gen *pycRe* fue reemplazado por ATG (4236889-4236908, secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- 50

El pJB137-PgapA-*pycRe* fue introducido por electroporación en la cepa MG1655 *metA\*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR\*(-35)-thrA\*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔtreBC::TT02-serA-serC*, que ha sido descrita en las solicitudes de patente EP10306164.4 y US61/406249. Se verificó la presencia del pJB137-PgapA-*pycRe* y la cepa seleccionada MG1655 *metA\*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR\*(-35)-thrA\*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔtreBC::TT02-serA-serC* pJB137-PgapA-*pycRe* recibió el nombre de cepa 1 (Tabla 1).

**3. Construcción de la cepa 2**

La cepa productora de metionina e hidroximetionina 2 (Tabla 1) ha sido descrita en las solicitudes de patente WO-A-2012055798, EP10306164.4 y US61/406249.

**4. Construcción de la cepa 3**

4.1. Construcción de MG1655 metA\*11 pKD46 ΔybdL::Km

Para eliminar el gen *ybdL* en la cepa MG1655 *metA\*11* pKD46, se usó el Protocolo 1 con la excepción de que los cebadores Ome 0589-DybdLF (SEC ID nº: 5) y Ome 0590-DybdLR (SEC ID nº: 6) fueron utilizados para amplificar el casete de resistencia a la kanamicina a partir del plásmido pKD4.

Ome 0589-DybdLF (SEC ID nº: 5)

CACCGACAGCGGAATCGCCGCTACGCCGTGCTCCTGCGTCAGCCACTGGCAAACCTCAACATCATCCAGGGTA  
GAAACCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

con:

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia corriente abajo del gen *ybdL* (633791-633870, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)
- secuencia en letra mayúscula subrayada correspondiente al sitio de cebador 1 del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

Ome 0590-DybdLR (SEC ID nº: 6)

GGTACAATAAAAAATGACAAATAACCCTCTGATTCCACAAAGCAAACCTTCCACAACCTGGCACCACTATTTTCACCC  
AGCATATGAATATCCTCCTTAG

con:

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia corriente arriba del gen *ybdL* (632797-632874, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)
- secuencia en letra mayúscula subrayada correspondiente al sitio de cebador 2 del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

Se escogieron los recombinantes resistentes a la kanamicina. Se verificó la inserción del casete de resistencia por PCR con los cebadores Ome 0591-ybdLR (SEC ID nº: 7) y Ome 0592-ybdLF (SEC ID nº: 8) y por secuenciación de ADN. La cepa verificada y seleccionada fue denominada MG1655 *metA\*11* Δ*ybdL*::*Km* pKD46.

Ome 0591-ybdLR (SEC ID nº: 7)

CGAAGTGCTGCGCCTGAAGC homóloga a la secuencia corriente arriba del gen *ybdM* (634054-634035, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Ome 0592-ybdLF (SEC ID nº: 8)

GCCGGGCGGACGACCACGCGG homóloga a la secuencia corriente abajo del gen *ybdH* (632663-632683, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

4.2. Transducción del ΔybdL

La delección Δ*ybdL*::*Km* fue transducida entonces en MG1655 *metA\*11* *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ*metJ* Δ*pykF* Δ*pykA* Δ*purU* Δ*yncA* Δ*malS*::*TTadc-CI857-PlambdaR\*(-35)-thrA\*1-cysE* Δ*pgaABCD*::*TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11* Δ*uxaCA*::*TT07-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11* Δ*CP4-6*::*TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11* Δ*wcaM*::*TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11* Δ*treBC*::*TT02-serA-serC*, que ha sido descrito en las solicitudes de patente EP10306164.4 y US61/406249, empleando un lisado de fago P1 (Protocolo 2) de la cepa MG1655 *metA\*11* pKD46 Δ*ybdL*::*Km* descrita más arriba en el capítulo 4.1.

Se seleccionaron los transductores resistentes a la kanamicina y se verificó la presencia de la modificación cromosómica Δ*ybdL*::*Km* por PCR con Ome 0591-ybdLR (SEC ID nº: 7) y Ome 0592-ybdLF (SEC ID nº: 8). La cepa

5 resultante tiene el siguiente genotipo MG1655 *metA\*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR\*(-35)-thrA\*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 DtreBC::TT02-serA-serC DybdL::Km.*

10 El pCL1920-PgapA-pycRe-TT07, que ha sido descrito en las solicitudes de patente EP10306164.4 y US61/406249, fue introducido por electroporación en dicha cepa. Se verificó la presencia del pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 y la cepa resultante MG1655 *metA\*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR\*(-35)-thrA\*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR\*(-35)-RBS01-thrA\*1-cysE-PgapA-metA\*11 DtreBC::TT02-serA-serC DybdL::Km*

15 pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 recibió el nombre de cepa 3 (Tabla 1).

### Ejemplo II: Producción de hidroximetionina por fermentación con un proceso en lote alimentado en condiciones de limitación de nitrógeno

20 Las cepas que produjeron cantidades sustanciales de metabolitos de interés en matraz fueron evaluadas seguidamente en condiciones de producción en fermentadores de 2,5 l (Pierre Guerin) utilizando una estrategia de lote alimentado por lotes. Las composiciones de los diferentes medios usados están indicadas en las Tablas 02 a 05.

25 En resumen, se usó un cultivo de 24 horas desarrollado en 10 ml de medio LB con 2,5 g.l<sup>-1</sup> de glucosa para inocular un precultivo de 24 horas en medio mínimo (B1a). Estas incubaciones fueron efectuadas en matraces con deflector de 500 ml con desviaciones que contenían 50 ml de medio mínimo (B1a) en un agitador rotativo (200 RPM.). El primer precultivo se realizó a una temperatura de 30°C, el segundo, a una temperatura de 34°C.

30 Una tercera etapa de precultivo se llevó a cabo en biorreactores (Sixfors) cargados con 200 ml de medio mínimo (B1b) inoculado a una concentración de biomasa de 1,2 g.l<sup>-1</sup> con 3 ml de cultivo previo concentrado. La temperatura del precultivo se mantuvo constante a 34°C y el pH fue ajustado automáticamente hasta un valor de 6,8 empleando una solución al 10% de NH<sub>4</sub>OH. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo constantemente ajustada a un valor de 30% de la saturación parcial de presión de aire con suministro de aire y/o agitación. Cuando se agotó la glucosa del medio del lote, se comenzó la alimentación por lotes con una velocidad de flujo inicial de 0,7 ml.h<sup>-1</sup>, aumentada exponencialmente durante 24 horas con una tasa de crecimiento de 0,13 h<sup>-1</sup> a fin de obtener una concentración celular final de aproximadamente 18 g.l<sup>-1</sup>.

35

Tabla 2: Composición del medio de precultivo mineral de lote (B1a y B1b).

Compuesto	Concentración B1a (g.l <sup>-1</sup> )	Concentración B1b (g.l <sup>-1</sup> )
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0130	0,0130
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0015	0,0015
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0150	0,0150
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0025	0,0025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0030	0,0030
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0025	0,0025
Citrato de Fe(III) H <sub>2</sub> O	0,1064	0,1064
EDTA	0,0084	0,0084
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,00	1,00
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,08	0,08
Ácido cítrico	1,70	1,70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,57	4,57
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	2,50	2,50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,10	1,10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,90	4,90
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,00	1,00
Tiamina	0,01	0,01
Vitamina B12	0,01	0,01

ES 2 528 495 T3

Glucosa	30,00	5,00
MOPS	30,00	0,00
NH <sub>4</sub> OH 28%	Ajuste hasta pH 6,8	Ajuste hasta pH 6,8

Tabla 3: Composición del medio mineral de precultivo alimentado por lotes (F1)

Compuesto	Concentración (g.l <sup>-1</sup> )
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,0104
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0012
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,0120
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0020
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0024
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0020
Citrato de Fe(III) H <sub>2</sub> O	0,0424
EDTA	0,0067
MgSO <sub>4</sub>	5,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,30
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,90
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	24,80
Tiamina	0,01
Glucosa	500,00
Vitamina B12	0,01
NH <sub>4</sub> OH 28%	Ajuste hasta pH 6,8

5

Tabla 4: Composición del medio mineral de cultivo en lote (B2).

Compuesto	Concentración (g.l <sup>-1</sup> )
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0130
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0015
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,0150
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0030
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0025
Citrato de Fe(III) H <sub>2</sub> O	0,1064
EDTA	0,0084
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,08
Ácido cítrico	1,70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,97
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	1,65
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,72
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3,74
Tiamina	0,01
Vitamina B12	0,01
Glucosa	10
NH <sub>4</sub> OH 28%	Ajuste hasta pH 6,8

Tabla 5: Composición del medio de cultivo alimentado por lotes (F2, F3 y F4).

Compuesto	Concentración F2 (g.l <sup>-1</sup> )	Concentración F3 (g.l <sup>-1</sup> )	Concentración F4 (g.l <sup>-1</sup> )
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0104	0,0104	0,0104
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0012	0,0012	0,0012
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0120	0,0120	0,0120
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0020	0,0020	0,0020
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0024	0,0024	0,0024
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0020	0,0020	0,0020
Citrato de Fe(III) H <sub>2</sub> O	0,0524	0,0524	0,0524
EDTA	0,0067	0,0067	0,0067
MgSO <sub>4</sub>	5,00	5,00	5,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	44,10	49,10	55,50
Tiamina	0,01	0,01	0,01
Vitamina B12	0,01	0,01	0,01
Glucosa	500	500	500
<b>Proporción C/N del medio alimentado por lotes (Cmol/mol)</b>	28	25	22
<b>Proporción C/N del medio de cultivo (Cmol/mol)*</b>	<b>25</b>	<b>23</b>	<b>21</b>

5 \*La proporción C/N del medio de cultivo (Cmol/mol) corresponde a la proporción C/N del medio de cultivo alimentado por lotes (B2) y el medio alimentado por lotes (F2, F3 o F4).

En medios diferentes cuando fue necesario se añadió espectinomycin y kanamicina a una concentración final de 50 mg.l<sup>-1</sup>, cloranfenicol a 30 mg.l<sup>-1</sup>, carbenicilina a 100 mg.l<sup>-1</sup> y gentamicina a 10 mg.l<sup>-1</sup>.

10 Seguidamente se cargaron fermentadores de 2,5 l (Pierre Guerin) con 600 ml de medio mínimo (B2) y fueron inoculados a una concentración de biomasa de 2,1 g.l<sup>-1</sup> con un volumen de precultivo de entre 55 y 70 ml.

15 La temperatura del cultivo se mantuvo constante a 37°C y el pH se mantuvo en el valor de trabajo (6,8) mediante la adición automática de soluciones de NH<sub>4</sub>OH (NH<sub>4</sub>OH 10% durante 9 horas y luego 28% hasta el final del cultivo). La velocidad inicial de agitación se ajustó a 200 RPM. durante la fase de lote y aumentó hasta 1000 R.P.M. durante la fase de alimentación por lotes. La tasa de flujo inicial de aire se configuró a 40 NL.h<sup>-1</sup> durante la fase de lote y se aumentó hasta 100 NL.h<sup>-1</sup> al comienzo de la fase de alimentación por lotes. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en valores de entre 20 y 40%, preferentemente 30%, de saturación mediante el aumento de la agitación.

20 Cuando la masa celular llegó a una concentración cercana a 5 g.l<sup>-1</sup>, se comenzó la alimentación por lotes con una tasa de flujo inicial de 5 ml.h<sup>-1</sup>. La solución alimentadora (F2, F3 o F4 según el experimento) fue inyectada con un perfil sigmoide con una velocidad de flujo creciente que llegó a 24 ml.h<sup>-1</sup> después de 26 horas. Las condiciones precisas de alimentación fueron calculadas con la ecuación:

$$25 \quad Q(t) = p1 + \frac{p2}{1 + e^{-p3(1-p4)}}$$

en la que Q(t) es la tasa de flujo de alimentación en ml.h<sup>-1</sup> para un volumen de lote de 600 ml con p1 = 1,80, p2 = 22,40, p3 = 0,270, p4 = 6,5.

30 Después de 26 horas de alimentación por lotes, se interrumpió el bombeo de las soluciones de alimentación y el cultivo se detuvo después de agotarse la glucosa.

35 Se cuantificaron los aminoácidos extracelulares por HPLC después de la derivatización OPA/Fmoc y se analizaron otros metabolitos relevantes usando HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa) y GC-MS después de la sililación.

A fin de aumentar la producción de hidroximetionina, realizamos fermentaciones en lote alimentado en condiciones de limitación de nitrógeno. Los cultivos fueron hechos tal cual se ha descrito arriba anteriormente con distintos medios de lote alimentado, denominados F2, F3 y F4, que contenían concentraciones aumentadas de amonio (ver composición en la Tabla 5).

5 Con el medio F2, la limitación de nitrógeno se produce aproximadamente 15 horas de cultivo mientras que con el medio F3, la limitación se produce aproximadamente 19 horas de iniciado el cultivo. Con la solución de lote alimentado F4, las células nunca estuvieron en condiciones de limitación de nitrógeno.

10 Con los medios F2 y F3, las concentraciones residual finales de amonio fueron cercanas a cero, como lo confirma la medición hecha por cromatografía iónica que se presenta en la figura 1 más adelante.

Los resultados indicados en la Tabla 6 muestran los niveles de hidroximetionina producidos por tres cepas recombinantes modificadas genéticamente para producir metionina e hidroximetionina (ver genotipos en la Tabla 1).

15 **Tabla 6:** Las concentraciones finales de metionina e hidroximetionina están indicadas en mM para las cepas 1, 2 y 3 cultivadas con diferentes soluciones de lote alimentado. Los números entre paréntesis indican el número de repeticiones del cultivo.

Medios de cultivo en lote alimentado	Cepa 1	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 3
Producto de fermentación	Metionina (mM)	Hidroxi-metionina (mM)	Metionina (mM)	Hidroxi-metionina (mM)	Metionina (mM)	Hidroxi-metionina (mM)
F2	291,5 ± 8,2 (N = 3)	10,5 ± 5,7 (N = 3)			283,4 ± nd (N = 1)	10,1 ± nd (N = 1)
F3	309,7 ± 16,5 (N = 4)	5,7 ± 3,5 (N = 4)	274,6 ± 6,2 (N = 4)	1,9 ± 0,3 (N = 4)		
F4	310,0 ± 9,5 (N = 3)	1,2 ± 1,0 (N = 3)	264,5 ± 13,4 (N = 2)	1,3 ± 0,1 (N = 2)	317,1 ± 19 (N = 2)	1,0 ± 0,6 (N = 2)

20 Como puede verse, cuanto más temprano se produce la limitación de nitrógeno durante el cultivo, mayor es la producción de hidroximetionina. Las cepas 1 y 3 cultivadas en el medio de cultivo en lote alimentado F2 producen más de 10mM de hidroximetionina pero solamente 1mM en F4.

25 **Referencias**

- Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128.
- Carrier y Keasling (1998) *Biotechnol. Prog.* 15, 58-64.
- 30 - Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640-6645.
- Liebl *et al.*, 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210.
- 35 - Miller, 1992; "A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Riedel *et al.* 2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583.
- 40 - J.A. Roels "Energetics and kinetics in biotechnology", Elsevier Science & Technology (Mayo de 1983).
- Sambrook *et al.* 1989. "Molecular Cloning: a Laboratory Manual". 2.<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Nueva York.
- 45 - Schaefer *et al.* 1999, *Anal. Biochem.* 270: 88-96.

**Listado de secuencias**

	<110> EXPLORADOR METABÓLICO	
5	<120> Producción fermentativa de análogo hidroxilo de metionina	
	<130> 357383	
	<160> 8	
10	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 41	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
20	<400> 1	
	acgtaagctt cgtttaaaca agcccaaagg aagagtgagg c	41
	<210> 2	
25	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> oligonucleótido	
	<400> 2	
	acgtaagctt accggtcacg tgcatatgt tccaccagct attgttag	49
35	<210> 3	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 3	
45	acgtcccggg caaggacggg cgaacgaaac c	31
	<210> 4	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 4	
55	acgtacgtag catatgccca tatccaagat actc	34
	<210> 5	
	<211> 100	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	

# ES 2 528 495 T3

	<400> 5		
	caccgacagc ggaatcgccg ctacgccgtg ctctgctgc agccactggc aaaactcaac	60	
	atcatccagg gtagaaaaccg tgtaggctgg agctgcttcg	100	
5	<210> 6 <211> 98 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
10	<220> <223> oligonucleótido		
	<400> 6		
	ggtacaataa aatgacaaa taaccctctg attccacaaa gcaaacttcc acaacttggc	60	
	accactattt tcaccagca tatgaatc ctccttag	98	
15	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
20	<220> <223> oligonucleótido		
25	<400> 7 cgaagtgctg cgctgaagc	20	
30	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
35	<220> <223> oligonucleótido		
	<400> 8 gccgggccga cgaccacgcg g	21	

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la producción fermentativa de hidroximetionina, que comprende las etapas siguientes:
  - 5       - cultivar un microorganismo recombinante modificado para producir metionina en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno,
  - recuperar la hidroximetionina del medio de cultivo,
  - 10       en el que el microorganismo recombinante se cultiva en condiciones de limitación de nitrógeno.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proporción molar de C/N del medio de cultivo es superior a 5, preferentemente superior a aproximadamente 10 y más preferentemente superior a 20.
- 15    3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la proporción molar de C/N está comprendida entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las siguientes etapas sucesivas:
  - 20       - hacer crecer un microorganismo recombinante en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno,
  - cultivar el microorganismo recombinante en condiciones de limitación de nitrógeno en dicho medio de cultivo apropiado,
  - 25       - recuperar la hidroximetionina del medio de cultivo.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el microorganismo se cultiva en un sistema de biorreactor en dos etapas sucesivas:
  - 30       - crecimiento de los microorganismos durante aproximadamente de 10 h a 20 h en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno, preferentemente durante aproximadamente de 15 h a 20 h,
  - 35       - cultivo de los microorganismos durante aproximadamente de 10 h a 20 h en condiciones de limitación de nitrógeno en un medio de cultivo apropiado, preferentemente durante aproximadamente de 10 h a 15 h.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo recombinante comprende por lo menos una de las siguientes modificaciones genéticas:
  - 40       - expresión aumentada de los siguientes genes: *metA\**, *metH*, *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP*, *metF*, *serB*, *thrA\**, *cysE*, *serA*, *serC*,
  - expresión atenuada de los siguientes genes: *metJ*, *pykF*, *pykA*, *purU*, *yncA*, *ybdL*.
  - 45
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el microorganismo recombinante comprende asimismo por lo menos una de las siguientes modificaciones:
  - 50       - expresión aumentada de los genes *pntAB* y/o *pyc*;
  - expresión atenuada del gen *udhA*.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fuente de carbono fermentable es glucosa o sacarosa.
- 55    9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la fuente de azufre en el medio de cultivo es sulfato, tiosulfato, sulfuro de hidrógeno, ditionato, ditionito, sulfito o una combinación de las distintas fuentes.
- 60    10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la hidroximetionina se recupera del medio de cultivo por extracción.

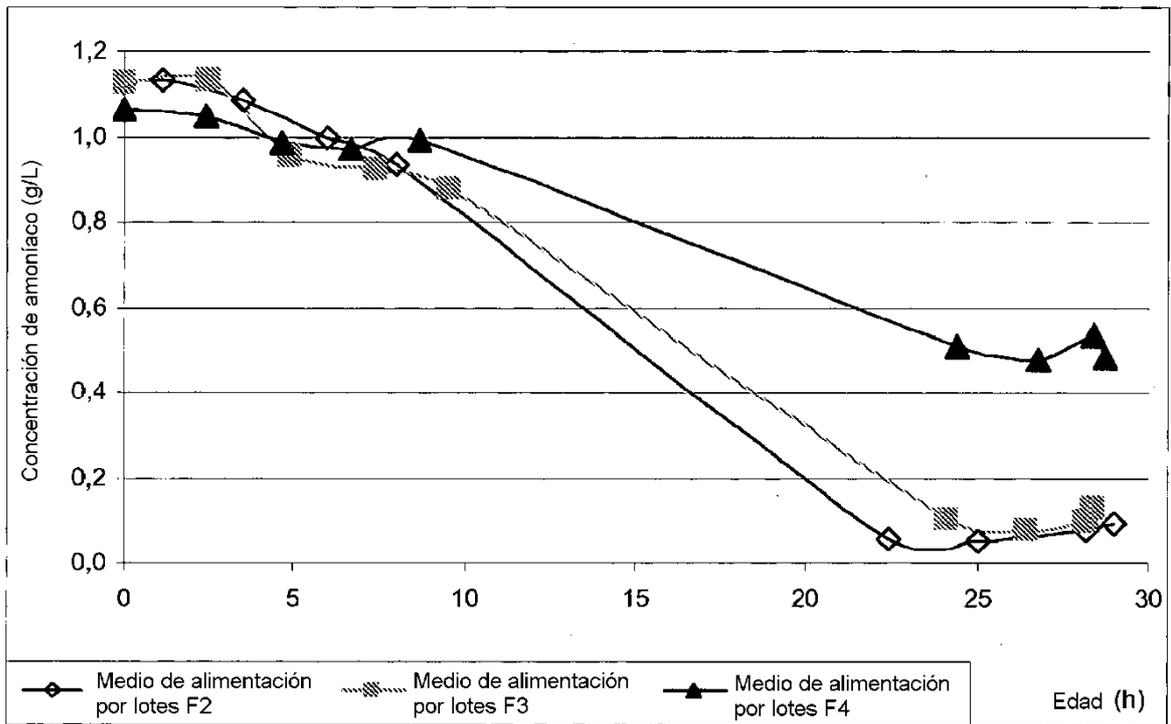


FIGURA 1