

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 375**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

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 12165779 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2520645**

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2015

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 534 375 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

CAMPO

5 Se dan a conocer composiciones, tales como microorganismos, enzimas y productos químicos, así como procedimientos para el uso de las mismas para producir metionina y productos relacionados.

ANTECEDENTES

10 La metionina es un aminoácido esencial en la dieta animal. La metionina se ha producido sintéticamente durante un extenso periodo de tiempo mediante diversas síntesis químicas multietapa que emplean acroleína, metilmercaptano y cianuro como materiales de partida. Existen dos formas de producto: D,L-metionina y su análogo hidroxílico. La D-metionina se convierte en el isómero L necesario *in vivo*, al contrario que todos los demás aminoácidos. Se ha reseñado que el mercado para metionina de pureza alimentaria está mejorando debido a una demanda aumentada en suplementos alimentarios para aves de corral y más recientemente cerdos. La capacidad de los productores líderes de metionina (Degussa AG, Adisseo y Novus) de satisfacer la demanda del mercado depende de los suministros de material bruto. Los intermediarios acroleína y metilmercaptano deben convertirse en 3-metilpropionaldehído (MMP) y después en metionina usando cianuro de hidrógeno. Los tres productores tienen planes para la expansión de sus instalaciones de producción de metionina e integración con la producción de material bruto también (Chem. Marketing Reporter de 7 de abril de 2003).

20 Las rutas biosintéticas para metionina (un miembro de la familia de aminoácidos de tipo aspartato) se han estudiado en una serie de organismos y muestran similitudes así como diferencias. La primera etapa dedicada, la acilación de homoserina, se cataliza 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 entonces en homocisteína a través de una ruta de transulfuración o sulfhidrilación directa. Se ha reseñado que ambas rutas están presentes y son funcionales en levadura, hongos, plantas verdes y la bacteria *Corynebacterium glutamicum*. *E. coli* posee solo la ruta de transulfuración. La ruta de transulfuración pasa por cistationina como intermedio y utiliza cisteína como donante de azufre. La ruta de sulfhidrilación directa implica la incorporación directa de sulfuro a la acilhomoserina. La última etapa de la ruta implica la conversión de homocisteína en metionina catalizada por una homocisteína metiltransferasa, codificada por los genes *metE* o *metH*. Otros aminoácidos importantes, tales como lisina, treonina y triptófano, se producen a través de la fermentación para uso en alimentación animal. Por lo tanto, estos aminoácidos pueden prepararse usando glucosa y otras fuentes renovables como materiales de partida. Desgraciadamente, la producción de metionina a través de la fermentación no ha sido tan exitosa y se usa todavía actualmente la síntesis química de metionina. Esto es en parte debido a la falta de una ruta biosintética genomanipulada eficaz para la producción de metionina y de un hospedador de producción adecuado.

35 El documento WO 2005/108561 se refiere a una enzima homoserina transuccinilasa recombinante con sensibilidad de retroalimentación alterada y a enzimas S-adenosilmetionina sintetasa recombinantes con actividad reducida para la producción de metionina.

El documento WO 2004/038013 se refiere a una homoserina transuccinilasa que exhibe una sensibilidad reducida hacia L-metionina o S-adenosilmetionina en comparación con una enzima homoserina transuccinilasa de tipo silvestre.

40 El documento WO 2004/035617 se refiere a una homoserina transuccinilasa que tiene al menos una mutación en comparación con una homoserina transuccinilasa de tipo silvestre y sensibilidad reducida hacia L-metionina o S-adenosilmetionina, en comparación con la enzima de tipo silvestre.

El documento WO 2006/138689 se refiere a cepas bacterianas genomanipuladas para aumentar la producción de aminoácidos, incluyendo aminoácidos derivados de aspartato.

45 El documento JP2000139471 se refiere a procedimientos de producción de L-metionina mediante el cultivo de un microorganismo capaz de producir L-metionina y por fermentación usando el mismo microorganismo.

Usuda *et al.*, "Effects of deregulation of methionine biosynthesis on methionine excretion in *Escherichia coli*", Applied and Environmental Microbiology, 71(6): 3228-3234, 2005, se refiere a los efectos de la desregulación de la biosíntesis de metionina sobre la excreción de metionina en *E. coli*.

50 La siguiente divulgación proporciona una ruta biosintética de metionina mejorada, así como un hospedador de producción.

SUMARIO

El objeto en cuestión para el que se busca protección es como se define en las reivindicaciones.

Se describe en la presente memoria la producción de metionina y productos relacionados, tales como S-adenosilmetionina (SAME), mediante fermentación. Se describen también microorganismos que se han genomanipulado para incluir moléculas de ADN recombinante y producir metionina.

5 Se describe un microorganismo que incluye una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica un péptido que tiene actividad de sulfhidrilación directa (EC 2.5.1.49, EC 4.2.99-) y secuencias de ácido nucleico 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.

10 En algunos ejemplos, la presencia de más de una ruta biosintética de metionina permite al organismo producir más metionina que la que se produciría en ausencia de la secuencia de ácido nucleico exógena que codifica el péptido que tiene actividad de sulfhidrilación directa.

15 En otros ejemplos, pueden estar activas más de dos rutas biosintéticas de metionina en el organismo. En estos ejemplos, una o más secuencias de ácido nucleico exógenas codifican 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.

En algunos ejemplos, los microorganismos genomanipulados para preparar metionina y productos relacionados, tales como SAME, producen al menos un 10 % de la metionina a partir de la actividad de la ruta biosintética de transulfuración. En otros ejemplos, producen al menos un 20, 30, 40 o al menos un 50 % del producto a partir de la actividad de la ruta biosintética de transulfuración.

20 En algunos ejemplos, los microorganismos genomanipulados para preparar metionina y productos relacionados, tales como SAME, producen al menos un 10 % de la metionina a partir de la actividad de la ruta biosintética de sulfhidrilación directa. En otros ejemplos, producen al menos un 20, 30, 40 o al menos un 50 % del producto a partir de la actividad de la ruta biosintética de transulfuración.

25 En algunos ejemplos, el microorganismo genomanipulado para preparar metionina y productos relacionados se ha genomanipulado adicionalmente para atenuar la actividad de un péptido codificado por un gen tal como *metD*, *metK*, *metJ*, *thrB*, *serA* o combinaciones de los mismos. En otros ejemplos, el microorganismo se genomanipula para sobreexpresar uno o más genes, tales como los genes *metA*, *metB*, *metC*, *metE*, *metY*, *metZ*, *metX*, *metH*, *cysPWUA*, *cysD*, *cysN*, *cysC*, *cysH*, *cysI*, *cysJ*, *cysG*, *cysK* y *cysM*.

30 Se describen también procedimientos de preparación de metionina y SAME. Estos procedimientos incluyen cultivar el microorganismo genomanipulado para preparar metionina y productos relacionados y aislar los productos. En algunos ejemplos, el microorganismo puede ser *E. coli*, *Pseudomonas* sp. o *Corynebacterium glutamicum*.

35 Se proporcionan en la presente memoria secuencias de ácido nucleico novedosas y sus correspondientes secuencias aminoacídicas (SEQ ID NO: 1 y 2). Estas secuencias de ácido nucleico, así como fragmentos y variantes de estas secuencias de ácido nucleico, son útiles para producir péptidos en microorganismos recombinantes. Los péptidos son útiles, entre otros, para producir metionina y SAME. Los péptidos, variantes de los mismos y fragmentos de los mismos son también útiles para producir agentes de unión específicos tales como anticuerpos.

40 Se da a conocer también un procedimiento de mejora de la asimilación de azufre sorteando el intermedio fosfoadenilil sulfato (PAPS). Este procedimiento puede usarse con cualquier microorganismo usado para producir metionina. El procedimiento se lleva a cabo introduciendo en un microorganismo una secuencia de ácido nucleico recombinante que permita la sobreexpresión de una o más adenilil sulfato reductasas (EC 1.8.9.92 o 1.8.4.9). La sobreexpresión puede ser por introducir secuencias de ácido nucleico recombinantes que alteran o introducen nuevos elementos de control, tales como promotores o potenciadores, que causan un aumento en la producción de adenilil sulfato reductasa endógena, o la secuencia de ácido nucleico recombinante puede codificar adenilil sulfato reductasa.

45 Estos y otros aspectos de la divulgación son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos ilustrativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 La **FIG. 1** es un diagrama que muestra tres rutas generales usadas por diversos microorganismos para producir metionina. Todas las rutas se basan en parte en el 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-acetilhomoserina u O-succinilhomoserina por MetA o MetX. Algunos microorganismos, tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp., utilizan polipéptidos MetA para preparar O-succinilhomoserina, mientras que otros microorganismos tales como *Corynebacterium* y *Leptospira* sp. usan MetX para preparar O-acetilhomoserina. O-succinilhomoserina y O-acetilhomoserina pueden convertirse directamente en homocisteína mediante sulfhidrilación, o pueden convertirse en homocisteína a través de transulfuración (ambas reacciones se describen con más detalle

en la presente memoria). Las enzimas asociadas a la transulfuración se identifican con dos asteriscos (**) y las enzimas asociadas a la sulfhidrilación se identifican con un solo asterisco (*).

5 La **FIG. 2** es una gráfica que muestra la acumulación de metionina en TF4076BJF, con solo actividad de transulfuración (TF4076BJF), solo actividad de sulfhidrilación (TF4076BJF-A) o ambas simultáneamente (TF4076BJF metYX(Lm)).

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 la retroalimentación (el producto acumulado en cada caso se muestra en el óvalo sombreado).

10 La **FIG. 4** muestra el curso temporal de acumulación de metionina producida por una cepa que expresa genes *metA* resistente a la inhibición por retroalimentación.

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

La **FIG. 6** muestra la ruta de asimilación de azufre nativa y una alternativa novedosa.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 Las secuencias de ácido nucleico y aminoácida enumeradas en el listado de secuencias acompañante se muestran usando abreviaturas estándares de tres letras para las bases nucleotídicas, y el código de tres letras para los aminoácidos. Se muestra solo una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida en cualquier referencia a la hebra exhibida.

Las **SEQ ID NO: 1-10** muestran secuencias de ácido nucleico y las correspondientes secuencias aminoácidas de diversos genes *metA* mutantes derivados de *E. coli*.

20 Las **SEQ ID NO: 11-34** muestran diversas secuencias cebadoras usadas en los ejemplos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Abreviaturas y términos

25 Las siguientes explicaciones de términos y procedimientos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los especialistas en la materia en la práctica de la presente divulgación. Como se usan en la presente memoria, “comprende” significa “incluye” y las formas singulares “un” o “una” o “el/la” incluyen las referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, la referencia a “comprende una célula” incluye una o una pluralidad de dichas células, y la referencia a “comprende el péptido de homocisteína sintasa” incluye la referencia a uno o más péptidos de homocisteína sintasa y equivalentes de los mismos conocidos por los especialistas en la materia, y así. El término “o” hace referencia a un solo elemento de elementos alternativos indicados o a una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, la frase “actividad de homocisteína sintasa o actividad de cistationina γ -sintasa” hace referencia a actividad de homocisteína sintasa, actividad de cistationina γ -sintasa o una combinación de ambas actividades de homocisteína sintasa y cistationina γ -sintasa.

35 A menos que se expliquen de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un especialista en la materia a la que esta divulgación pertenece. Aunque pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente divulgación, se describen a continuación los procedimientos y materiales adecuados. Los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes. Son evidentes otros rasgos y ventajas de la divulgación a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Números de acceso: los números de acceso a lo largo de esta descripción derivan de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mantenida por los Institutos Nacionales de Salud, EE.UU. Los números de acceso son como se proporcionan en la base de datos a 20 de febrero de 2007.

45 **Números de clasificación de enzimas (EC):** Los números EC proporcionados a lo largo de esta descripción derivan de la base de datos KEGG Ligand, mantenida por la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics, patrocinada en parte por la Universidad de Tokio. Los números EC son como se proporcionan en la base de datos a 20 de febrero de 2007.

50 **Atenuar:** Reducir el impacto, actividad o fuerza de algo. En un ejemplo, se reduce la sensibilidad de una enzima particular ante la inhibición por retroalimentación o inhibición causada por una composición que no es un producto ni un reactante (retroalimentación no específica de ruta) de tal modo que la actividad enzimática no se vea afectada por la presencia de un compuesto. Por ejemplo, el gen *metA* y su correspondiente secuencia aminoácida (tal como las secuencias ejemplares proporcionadas en la SEQ ID NO: 2) muestran varias mutaciones que atenúan su sensibilidad ante la inhibición por retroalimentación. La atenuación de la sensibilidad de MetA se describe con más

detalle en el ejemplo 3.B. En otro ejemplo, puede hacerse referencia a una enzima que es menos activa como atenuada.

ADNc (ADN complementario): Un trozo de ADN que carece de segmentos internos no codificantes (intrones) y de secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc puede sintetizarse mediante transcripción inversa de ARN mensajero extraído de células.

Delección: La retirada de uno o más nucleótidos de una molécula de ácido nucleico o de uno o más aminoácidos de una proteína, estando unidas entre sí las regiones en cada lado.

Detectable: Que puede confirmarse su existencia o presencia. Por ejemplo, la producción de un producto a partir de un reactante, por ejemplo la producción de O-succinilhomoserina u homocisteína, es detectable si la señal generada por el producto o el reactante es suficientemente fuerte para medirse.

Actividad de sulfhidrilación directa: La capacidad de hacer reaccionar OSHS u OAHS directamente con S²⁻ produciendo homocisteína. Los péptidos que tienen esta actividad incluyen, por ejemplo, homocisteína sintasas (EC 4.2.99.- EC 2.5.1.49), que están codificadas por genes tales como *metZ* y *metY*.

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

Endógeno: Como se usa en la presente memoria con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula o microorganismo particular, hace referencia a una secuencia de ácido nucleico o péptido que está en la célula y no se ha dispuesto 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, tales como secuencias promotoras o potenciadoras que activan la transcripción o traducción, se han alterado mediante técnicas recombinantes.

Exógeno: Como se usa en la presente memoria con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula particular, hace referencia a cualquier molécula de ácido nucleico que no es originaria de esa célula particular como se encuentra en la naturaleza. Por tanto, una molécula de ácido nucleico de origen no natural se considera que es exógena de una célula una vez introducida en la célula. Una molécula de ácido nucleico que es de origen natural puede ser también exógena para una célula particular. Por ejemplo, una secuencia codificante completa aislada de la célula X es un ácido nucleico exógeno con respecto a una célula Y una vez se introduce esa secuencia codificante en la célula Y, incluso si X e Y son el mismo tipo de célula.

Expresión: El proceso mediante el cual se convierte la información codificada en un gen en las estructuras y funciones de una célula, tales como una proteína, ARN de transferencia o ARN ribosómico. Los genes expresados incluyen aquellos que se transcriben a ARNm y se traducen entonces a proteína y aquellos que se transcriben a ARN pero no se traducen a proteína (por ejemplo, ARN de transferencia y ribosómico).

Delección funcional: Una mutación, delección parcial o completa, inserción u otra variación realizada a una secuencia génica que reduce o inhibe la producción del producto génico o vuelve el producto génico no funcional. Por ejemplo, la delección funcional de *metJ* en *E. coli* reduce la represión de la ruta biosintética de metionina. En otro ejemplo, la delección funcional de *thrB* en *E. coli* reduce el uso de homoserina en la ruta biosintética de treonina. En algunos casos, la delección funcional se describe como una mutación de desactivación.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína o célula) se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en los que el componente aparece naturalmente, tales como otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos y proteínas. Las moléculas de ácido nucleico y proteínas que se han "aislado" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por procedimientos de purificación estándares. El término engloba también moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas mediante expresión recombinante en una célula hospedadora así como moléculas de ácido nucleico y proteínas sintetizadas químicamente.

En un ejemplo, aislado hace referencia a una molécula de ácido nucleico de origen natural que no es inmediatamente contigua a ambas de las secuencias con que es inmediatamente contigua (una en el extremo 5' y otra en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que deriva.

Molécula de ácido nucleico: Comprende tanto moléculas de ARN como de ADN incluyendo, sin limitación, ADNc, ADN genómico y ARNm. Incluye ácidos nucleicos sintéticos tales como aquellas que se sintetizan químicamente o se producen recombinantemente. La molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o

monocatenaria. Cuando es monocatenaria, la molécula de ácido nucleico puede ser la hebra codificante o la hebra anticodificante. Además, la molécula de ácido nucleico puede ser circular o lineal.

Ligado operativamente: Una primera secuencia de ácido nucleico está ligada operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está dispuesta en relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor se liga operativamente con una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN ligadas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura. Las configuraciones de genes separados que se transcriben en serie como un solo ARN mensajero se designan como operones. Por tanto, disponer genes en una estrecha proximidad, por ejemplo en un vector de plásmido, bajo la regulación transcripcional de un solo promotor, constituye un operón sintético.

ORF (marco abierto de lectura): Una serie de tripletes nucleotídicos (codones) que codifican péptidos, polipéptidos o aminoácidos sin codones de terminación. Estas secuencias son habitualmente traducibles a un péptido.

Purificado: El término purificado no requiere la pureza absoluta, en lugar de ello, se entiende como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de péptido purificado, tal como una preparación de succinilCoA homoserina aciltransferasa u homocisteína sintasa, es aquella en que el péptido está más concentrado que cuando el péptido está en su entorno en una célula. Por ejemplo, un péptido purificado es aquel que está sustancialmente separado de componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y otros péptidos) que pueden acompañarlo. En otro ejemplo, es una preparación de péptido purificado aquella en que el péptido está sustancialmente exento de contaminantes, tales como aquellos que podrían estar presentes después de la síntesis química del péptido.

En un ejemplo, un péptido está purificado cuando al menos aproximadamente un 50 % en peso de una muestra está compuesto por péptido, por ejemplo, cuando al menos aproximadamente un 60, 70, 80, 85, 90, 92, 95, 98 o 99 % o más de una muestra está compuesto por péptido. Los ejemplos de procedimientos que pueden usarse para purificar un péptido incluyen, pero sin limitación, los procedimientos dados a conocer en Sambrook *et al.* ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, cap. 17). La pureza de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de visualización de una sola banda peptídica tras tinción del gel de poliacrilamida, cromatografía líquida de alta resolución, secuenciación u otro procedimiento convencional.

Recombinante: Una molécula de ácido nucleico o proteína recombinante es aquella que tiene una secuencia que no es de origen natural, tiene una secuencia que está compuesta por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo, o ambas cosas. Esta combinación artificial puede conseguirse, por ejemplo, mediante síntesis química o la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácido nucleico o proteínas, tales como técnicas de genomanipulación. Recombinante se usa también para describir moléculas de ácido nucleico que se han manipulado artificialmente, pero que contienen las mismas secuencias reguladoras y regiones codificantes que se encuentran en el organismo del que se aisló el ácido nucleico.

Identidad/similitud de secuencia: La identidad/similitud entre dos o más secuencias de ácido nucleico, o dos o más secuencias aminoacídicas, se expresa en términos de identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia puede medirse en términos de porcentaje de identidad: cuanto mayor es el porcentaje, más idénticas son las secuencias. La similitud de secuencia puede medirse en términos de porcentaje de similitud (que tiene en cuenta las sustituciones aminoacídicas conservativas), cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las secuencias. Los homólogos u ortólogos de secuencias de ácido nucleico o aminoacídicas poseen un grado relativamente alto de identidad/similitud de secuencia cuando se alinean usando procedimientos estándares.

Los procedimientos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la materia. Se describen diversos programas y algoritmos de alineamiento en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene*, 73: 237-44, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-3, 1989; Corpet *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 16: 10881-90, 1988; Huang *et al.* *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992 y Pearson *et al.*, *Meth. Mol. Bio.* 25 24: 307-31, 1994. Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, 1990, presenta una consideración detallada de procedimientos de alineamiento de secuencia y cálculos de homología.

La herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, 1990) está disponible en varias fuentes, incluyendo el National Center for Biological Information (NCBI, National Library of Medicine, edificio 38A, sala 8N805, Bethesda, MD 20894) y en internet, para uso junto con a los programas de análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Puede encontrarse información adicional en el sitio web del NCBI.

Se usa BLASTN para comparar secuencias de ácido nucleico, mientras que se usa BLASTP para comparar secuencias aminoacídicas. Para comparar dos secuencias de ácido nucleico, pueden asignarse las opciones como sigue: -i se asigna a un fichero que contiene la primera secuencia de ácido nucleico para comparar (tal como

C:\seq1.txt); -j se asigna a un fichero que contiene la segunda secuencia de ácido nucleico para comparar (tal como C:\seq2.txt); -p se asigna a blastn; -o se asigna a cualquier nombre de fichero deseado (tal como C:\output.txt); -q se asigna a -1; -r se asigna a 2 y todas las demás opciones se dejan en sus ajustes por defecto. Por ejemplo, puede usarse el siguiente comando para generar un fichero de salida que contiene la comparación entre dos secuencias:

```
C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q -1 -r 2.
```

Para comparar dos secuencias aminoacídicas, pueden asignarse las funciones de B12seq como sigue: -i se asigna a un fichero que contiene la primera secuencia aminoacídica para comparar (tal como C:\seq1.txt); j se asigna a un fichero que contiene la segunda secuencia aminoacídica para comparar (tal como C:\seq2.txt); -p se asigna a blastp; -o se asigna a cualquier nombre de fichero deseado (tal como C:\output.txt) y todas las demás opciones se dejan en sus ajustes por defecto. Por ejemplo, puede usarse el siguiente comando para generar un fichero de salida que contiene una comparación entre dos secuencias aminoacídicas: C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el fichero de salida designado presentará las regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el fichero de salida designado no presentará secuencias alineadas.

Una vez alineadas, se determina el número de coincidencias contando el número de posiciones donde se presenta un nucleótido o residuo aminoacídico idéntico en ambas secuencias. Se determina el porcentaje de identidad de secuencia dividiendo el número de coincidencias entre la longitud de la secuencia identificada, o entre una longitud articulada (tal como 100 nucleótidos o residuos aminoacídicos consecutivos de una secuencia expuesta en una secuencia identificada), seguido de la multiplicación del valor resultante por 100. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que tiene 1166 coincidencias cuando se alinea con una secuencia de ensayo que tiene 1554 nucleótidos es un 75,0 % idéntica a la secuencia de ensayo ($1166/1554 \cdot 100 = 75,0$). El valor de porcentaje de identidad de secuencia se redondea a la décima más cercana. Por ejemplo, 75,11, 75,12, 75,13 y 75,14 se redondean a la baja a 75,1, mientras que 75,15, 75,16, 75,17, 75,18 y 75,19 se redondean al alza a 75,2. El valor de longitud será siempre un entero.

Para comparaciones de secuencias aminoacídicas de más de aproximadamente 30 aminoácidos, se emplea la función de secuencias Blast 2 que usa la matriz BLOSUM62 por defecto asignada a parámetros por defecto (coste de existencia de hueco de 11 y coste de hueco por residuo de 1). Los homólogos se caracterizan típicamente por una posesión de aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia contada a lo largo de todo el alineamiento con la secuencia aminoacídica usando el blastp con huecos Basic Blast 2.0 del NCBI, con bases de datos tales como la base de datos nr o swissprot. Se filtran las consultas inspeccionadas con el programa blastn con DUST (Hancock y Armstrong, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10: 67-70). Otros programas usan SEG. Además, puede efectuarse un alineamiento lineal. Las proteínas con aún mayor similitud mostrarán porcentajes de identidad crecientes cuando se valoren mediante este procedimiento, tal como una identidad de secuencia de al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 % o al menos 99 % con la secuencia objeto (concretamente, la secuencia identificada por el número de acceso o similar), reteniendo la actividad de la secuencia objeto. En algunos ejemplos, la secuencia objeto tendrá mayor actividad que la secuencia nativa y, en aún otros ejemplos, será menos activa.

Cuando se alinean péptidos cortos (menos de aproximadamente 30 aminoácidos), el alineamiento deberá efectuarse usando la función de secuencias Blast 2 que emplea la matriz PAM30 asignada a parámetros por defecto (penalizaciones de abertura de hueco 9, de extensión de hueco 1). Las proteínas con similitud aún mayor con la secuencia de referencia mostrarán porcentajes de identidad crecientes cuando se valoren mediante este procedimiento, tal como al menos 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 % de identidad de secuencia. Cuando se compara menos de la secuencia completa para identidad de secuencia, los homólogos poseerán típicamente al menos un 75 % de identidad de secuencia en ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de secuencia de al menos 85, 90, 95 o 98 %, dependiendo de su identidad con la secuencia de referencia. Se describen en el sitio web del NCBI los procedimientos para determinar la identidad de secuencia en dichas ventanas cortas.

Las secuencias de ácido nucleico que no muestran un alto grado de identidad pueden codificar no obstante secuencias aminoacídicas idénticas o similares (conservadas) debido a la degeneración del código genético. Pueden hacerse cambios en una secuencia de ácido nucleico usando esta degeneración para producir múltiples moléculas de ácido nucleico que codifican todas sustancialmente la misma proteína. Dichas secuencias de ácido nucleico homólogas pueden poseer, por ejemplo, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia objeto (secuencias identificadas por el número de acceso o similar).

Un especialista en la materia apreciará que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan solo como guía; es posible que puedan obtenerse homólogos altamente significativos que caigan fuera de los intervalos proporcionados.

Célula transformada: Una célula en que se ha introducido una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ácido nucleico de succinilCoA homoserina aciltransferasa u homocisteína sintasa, por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular. La transformación engloba todas las técnicas mediante las que puede introducirse una

molécula de ácido nucleico en dicha célula, incluyendo pero sin limitación, transfección con vectores víricos, conjugación, transformación con vectores de plásmido e introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección y aceleración por pistola de partículas.

5 **Actividad de transulfuración:** Una actividad que producen metionina o SAME a través del intermedio cistationina. Los péptidos que tienen esta actividad incluyen cistationina γ -sintasa (EC 2.5.1.48) y cistationina β -liasa (EC 4.4.1.8), estos péptidos están codificados por los genes *metB* y *metC*, respectivamente. Puede usarse cualquier combinación de péptidos de cistationina γ -sintasa (EC 4.2.99.9) y cistationina β -liasa (EC 4.4.1.8) para permitir que un microorganismo posea actividad de transulfuración.

10 **En condiciones que permitan la producción de producto:** Cualquier condición de fermentación que permita que un microorganismo produzca un producto deseado, tal como metionina o SAME. Las condiciones incluyen habitualmente temperatura, aireación y medio. El medio puede ser un caldo o un gel. Generalmente, el medio incluye una fuente de carbono tal como glucosa, fructosa, celulosa o similar que puede metabolizarse por el microorganismo directamente, o pueden usarse enzimas en el medio para facilitar el metabolismo de la fuente de carbono. Para determinar si las condiciones de cultivo permiten la producción de producto, puede cultivarse el
15 microorganismo durante 24, 36 o 48 horas y tomarse una muestra. Puede ensayarse entonces en las células de la muestra la presencia del producto deseado. Por ejemplo, cuando se ensaya la presencia de metionina o SAME, pueden usarse los ensayos proporcionados en la sección de ejemplos.

20 **Vector:** Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula, produciendo así una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicar en la célula, tal como un origen de replicación. Un vector puede incluir también uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la materia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Rutas de producción de metionina

25 Como se muestra en la FIG. 1, pueden usarse muchas rutas biosintéticas para producir metionina o sus intermedios tales como fosfato de aspartilo, semialdehído aspártico, homoserina, O-succinilhomoserina (OSHS), O-acetilhomoserina (OAHS), cistationina, homocisteína, metionina y S-adenosilmetionina (SAME). Con los fines de esta divulgación, puede hacerse referencia a un intermedio como un reactante o un producto, dependiendo del contexto. Por ejemplo, cuando se discute la conversión de aspartato en fosfato de aspartilo usando una aspartato cinasa, el aspartato es el reactante y el fosfato de aspartilo es el producto. De forma similar, cuando la descripción describe la
30 conversión de fosfato de aspartilo en semialdehído aspártico usando una semialdehído aspártico deshidrogenasa, el fosfato de aspartilo es el reactante y el semialdehído aspártico es el producto. Un especialista en la materia apreciará que la FIG. 1 muestra muchas rutas biosintéticas porque en cada clase de enzima proporcionada hay muchas enzimas que pueden usarse para convertir un reactante en un producto y, por lo tanto, realizar una ruta. Además, estas reacciones pueden llevarse a cabo *in vivo*, *in vitro* o mediante una combinación de reacciones *in vivo*
35 y reacciones *in vitro*, tales como reacciones *in vitro* que incluyen reacciones químicas no enzimáticas.

El microorganismo hospedador puede proporcionar también intermedios a la ruta al incluir los intermedios en la materia prima de la fermentación. Por tanto, si la ruta biosintética produce menos de la cantidad deseada de un intermedio dado, ese intermedio puede añadirse a la materia prima. Esto puede hacerse en un ajuste de fermentación continua o en un ajuste de fermentación por lotes.

40 Los especialistas en la materia reconocerán que un hospedador de producción usa fuentes de carbono distintas de glucosa. Las fuentes de carbono alternativas 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 el medio de fermentación.

A. Glucosa a aspartato

45 Los microorganismos producen generalmente aspartato a partir de glucosa. Un especialista en la materia apreciará que existen muchos procedimientos para aumentar la concentración de aspartato en cepas de producción. Por ejemplo, aumentar la expresión de las enzimas piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa, alterar la desviación de glioxilato o eliminar el consumo de piruvato en otros productos tales como acetato o etanol.

50 Como alternativa, el aspartato puede incluirse en la materia primera de fermentación, tomarse por el microorganismo, y usarse como reactantes en la ruta biosintética de metionina.

El aspartato sirve también como intermedio en las rutas biosintéticas de lisina, treonina y asparagina. Por lo tanto, puede ser deseable atenuar o retirar (desactivar) estas rutas, permitiendo por tanto usar más aspartato en la ruta de producción de metionina.

B. Aspartato a fosfato de aspartilo

Los hospedadores de producción pueden genomanipularse usando polipéptidos conocidos para producir fosfato de aspartilo, o sobreproducir fosfato de aspartilo. Por ejemplo, puede usarse la aspartato cinasa resistente a retroalimentación descrita en el documento W004069996A2 para reemplazar a una aspartato cinasa endógena o además de una aspartato cinasa endógena.

- 5 Como se usa en la presente memoria, aspartato cinasa incluye péptidos de la clasificación de enzimas número (EC) 2.7.2.4, así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de aspartato en fosfato de aspartilo. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de aspartato cinasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de aspartato cinasa aceptarán otros sustratos además de aspartato. Por lo tanto, se incluyen también dichos péptidos de aspartato cinasa no específicos. Las secuencias de aspartato cinasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los n° de acceso a GenBank: NZ_AAVY01000022, NC_006958 y NZ_AAWW01000055 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de aspartato cinasa y los n° de acceso a GenBank: NP_418448, NP_599504 y ZP_01638096 dan a conocer secuencias de péptido de aspartato cinasa. Los ensayos para caracterizar la actividad de aspartato cinasa de un péptido particular son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Cohen, GN, Methods in Enzymology, 113: 596: 600, 15 1985, para caracterizar la actividad de un péptido específico.

C. Fosfato de aspartilo a semialdehído aspártico

Los hospedadores de producción pueden genomanipularse usando polipéptidos conocidos para producir semialdehído aspártico, o sobreproducir semialdehído aspártico. Es un procedimiento de aumento de la producción de productos en la ruta biosintética de metionina mediante sobreexpresión o expresión de una forma más activa de semialdehído aspártico deshidrogenasa.

- 20 Como se usa en la presente memoria, la semialdehído aspártico deshidrogenasa incluye péptidos de semialdehído aspártico deshidrogenasa (EC 1.2.1.11), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de fosfato de aspartilo en semialdehído aspártico. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de semialdehído aspártico deshidrogenasa catalizarán también otras reacciones. Por ejemplo, algunos péptidos de semialdehído aspártico deshidrogenasa aceptarán otros sustratos además de fosfato de aspartilo, y por lo tanto, se incluyen también dichos péptidos de semialdehído aspártico deshidrogenasa no específicos. Las secuencias de semialdehído aspártico deshidrogenasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los n° de acceso a GenBank: NC_006958, NZ_AAVY01000015 y NZ_AAWW01000010 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de semialdehído aspártico deshidrogenasa y los n° de acceso a GenBank NP_417891, NP_599505 y ZP_0164))72 dan a conocer secuencias de péptido de semialdehído aspártico deshidrogenasa. Son bien conocidos en la materia ensayos para caracterizar la actividad de semialdehído aspártico deshidrogenasa de un péptido particular. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Cohen, GN., Methods in Enzymology, 113: 600-602, 25 1985, para caracterizar la actividad de un péptido específico.

D. Semialdehído aspártico a homoserina

35 Los hospedadores de producción pueden genomanipularse usando polipéptidos conocidos para producir homoserina, o sobreproducir homoserina. Un procedimiento de aumento de la producción de productos en la ruta biosintética de metionina es mediante la sobreexpresión o expresión de una forma más activa de semialdehído aspártico deshidrogenasa.

- 40 Como se usa en la presente memoria, la homoserina deshidrogenasa incluye péptidos de homoserina deshidrogenasa (EC 1.1.1.3), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de semialdehído aspártico en homoserina. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de homoserina deshidrogenasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de homoserina deshidrogenasa aceptarán otros sustratos además del semialdehído aspártico. Por lo tanto, se incluyen también dichos péptidos de homoserina deshidrogenasa no específicos. Las secuencias de péptidos de homoserina deshidrogenasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los n° de acceso a GenBank: NC_006958, NZ_AAVY01000013 y NZ_AAWW01000033 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de homoserina deshidrogenasa y los n° de acceso a GenBank: NP_414543, ZP_01639819 y NP_600409 dan a conocer secuencias de péptido de homoserina deshidrogenasa. Son bien conocidos en la materia ensayos para caracterizar la actividad de homoserina deshidrogenasa. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Patte *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 128: 426-439, 1966, para caracterizar la actividad de un péptido específico.

E. Homoserina a O-succinilhomoserina (OSHS)

Los hospedadores de producción pueden genomanipularse usando polipéptidos conocidos para producir O-succinilhomoserina (OSHS), o sobreproducir OSHS. Es un procedimiento de aumento de la producción de productos en la ruta biosintética de la metionina mediante sobreexpresión o expresión de una forma más activa de péptidos de homoserina O-succiniltransferasa, o usando una forma insensible a la inhibición por retroalimentación de péptidos de homoserina O-succiniltransferasa.

Como se usa en la presente memoria, la succinilCoA 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. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de homoserina O-succiniltransferasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo, algunos péptidos de succinilCoA homoserina aciltransferasa aceptarán otros sustratos además de la homoserina. Por lo tanto, se incluyen también dichos péptidos de succinilCoA homoserina aciltransferasa no específicos. Las secuencias peptídicas de homoserina O-succiniltransferasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, el nº de acceso a GenBank: NZ_AAWW01000055 da a conocer una secuencia de ácido nucleico de homoserina O-succiniltransferasa y el nº de acceso a GenBank: AAC76983 da a conocer una secuencia de péptido de homoserina O-succiniltransferasa. Son bien conocidos en la materia ensayos para caracterizar la actividad de succinilCoA homoserina aciltransferasa. Por ejemplo, el ensayo descrito por Lawrence, *J. Bacteriol.*, 109: 8-11, 1972, puede usarse para caracterizar la actividad de un péptido específico. Se hace referencia también a los genes que codifican péptidos de succinilCoA homoserina aciltransferasa en la presente memoria como *metA*.

F. Homoserina a O-acetilhomoserina (OAHS)

Los hospedadores de producción pueden genomanipularse usando polipéptidos para producir O-acetilhomoserina (OAHS), o sobreproducir OAHS. Es un procedimiento de aumento de la producción de productos en la ruta biosintética de metionina mediante sobreexpresión o expresión de una forma más activa de péptidos de homoserina O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31).

Como se usa en la presente memoria, la 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. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de homoserina O-acetiltransferasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de homoserina O-acetiltransferasa aceptarán otros sustratos además de la homoserina. Por lo tanto, se incluyen también dichos péptidos de homoserina O-acetiltransferasa no específicos. Las secuencias de péptidos de homoserina O-acetiltransferasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los nº de acceso a GenBank: Y10744 REGIÓN: 2822..3961, NZ_AAAH02000004 REGIÓN: 166057..167193 y NZ_AAAY02000081 REGIÓN: complemento (11535..12605) dan a conocer secuencias de ácido nucleico de homoserina O-acetiltransferasa y los nº de acceso a GenBank: CAA71733, ZP_00766367 y ZP_00107218 dan a conocer secuencias de péptido de homoserina O-acetiltransferasa. Son bien conocidos en la materia ensayos para caracterizar la actividad de homoserina O-acetiltransferasa. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Lawrence, *J. Bacteriol.*, 109: 8-11, 1972, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Se hace referencia también en la presente memoria a los genes que codifican péptidos de homoserina O-acetiltransferasa como *metX*.

G. Sulfhidrilación

Se lleva a cabo la producción de homocisteína por sulfhidrilación directa mediante enzimas homocisteína sintasa, algunas de estas enzimas utilizan OSHS como sustrato, y algunas utilizan OAHS como sustrato. Adicionalmente, algunas de las enzimas pueden utilizar OSHS u OAHS como sustratos.

1. O-Succinilhomoserina (OSHS) a homocisteína

Los hospedadores de producción pueden genomanipularse usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o sobreproducir homocisteína. Es un procedimiento de aumento de la producción de productos en la ruta biosintética de metionina mediante sobreexpresión o expresión de una forma más activa de péptidos de homocisteína sintasa (EC 4.2.99.-).

Como se usa en la presente memoria, la 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. Se hace referencia a la conversión de OSHS en homocisteína mediante reacción con sulfuro en la presente memoria como sulfhidrilación directa. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de homocisteína sintasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de homocisteína sintasa aceptarán otros sustratos además de la OSHS. Por lo tanto, dichos péptidos de homocisteína sintasa se incluyen también. Las secuencias de péptidos de homocisteína sintasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, el nº de acceso a GenBank: AE004091 da a conocer secuencias de ácido nucleico de homocisteína sintasa (O-succinil-L-homoserina sulfhidrilasa) y el nº de acceso a GenBank: AAG06495 da a conocer una secuencia aminoacídica de homocisteína sintasa (O-succinil-L-homoserina sulfhidrilasa). Son bien conocidos en la materia ensayos para caracterizar la actividad de homocisteína sintasa de un péptido particular. 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. Se hace referencia también en la presente memoria a genes que codifican homocisteína sintasa como *metZ*.

2. O-Acetilhomoserina (OAHS) a homocisteína

Los hospedadores de producción pueden genomanipularse usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o sobreproducir homocisteína. Es un procedimiento de aumento de la producción de productos en la ruta biosintética de metionina mediante sobreexpresión o expresión de una forma más activa de péptidos de homocisteína sintasa (EC 2.5.1.49).

Como se usa en la presente memoria, la 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. Se hace referencia a la conversión de OAHS en homocisteína mediante reacción con sulfuro en la presente memoria como sulfhidrilación directa. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de homocisteína sintasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo, algunos péptidos de homocisteína sintasa descritos en el ejemplo 2 siguiente, aceptan OAHS o OSHS como sustrato, por lo tanto, se incluyen también dichos péptidos de homocisteína sintasa no específicos. Las secuencias de péptidos de homocisteína sintasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los n° de acceso a GenBank: AE004091 REGIÓN: 5655648..5656925, Y10744 REGIÓN: 1485..2813, NZ_AAAH02000004 REGIÓN: 164536..165990 y NZ_AAAY02000081 REGIÓN: complemento (12750..14054) dan a conocer secuencias de ácido nucleico de homocisteína sintasa (O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa) y los n° de acceso a GenBank: AAG08410, CAA71732, ZP_00766366 y ZP_00107219 dan a conocer secuencias aminoacídicas de homocisteína sintasa (O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa). Son bien conocidos en la materia ensayos para caracterizar la actividad de homoserina sintasa de un péptido particular. 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. Se hace también referencia en la presente memoria a los genes que codifican péptidos de homocisteína sintasa como *metY*.

H. Transulfuración

1. O-Succinilhomoserina (OSHS) o acetilhomoserina (OAHS) a cistationina

Los hospedadores de producción pueden genomaniplarse usando polipéptidos conocidos para producir cistationina, o sobreproducir cistationina. Es un procedimiento de aumento de la producción de productos en la ruta biosintética de metionina mediante sobreexpresión o expresión de una forma más activa de péptidos de cistationina γ -sintasa (EC 2.5.1.48).

Como se usa en la presente memoria, la cistationina γ -sintasa incluye péptidos de cistationina γ -sintasa (EC 2.5.1.48), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de OSHS o OAHS en cistationina. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de cistationina γ -sintasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo, algunos péptidos de cistationina γ -sintasa aceptarán otros sustratos además de OSHS u OAHS. Por lo tanto, se incluyen también dichos péptidos de cistationina γ -sintasa no específicos. Las secuencias de péptidos de cistationina γ -sintasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los n° de acceso a GenBank NC_006958, NZ_AAWW01000006 y NC_004129 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de cistationina γ -sintasa y los n° de acceso a GenBank: NP_418374, YP_348978 y NP_601979 dan a conocer secuencias de péptido de cistationina γ -sintasa. Son bien conocidos en la materia ensayos para caracterizar la actividad de cistationina γ -sintasa de un péptido particular. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito en Methods in Enzymology, 17: 425-433, 1971 para caracterizar la actividad de un péptido específico. Se hace también referencia en la presente memoria a los genes que codifican péptidos de cistationina γ -sintasa como *metB*.

2. Cistationina a homocisteína

Los hospedadores de producción pueden genomaniplarse usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o sobreproducir homocisteína. Es un procedimiento de aumento de la producción de productos en la ruta sintética de metionina mediante sobreexpresión o expresión de una forma más activa de péptidos de cistationina β -liasa (EC 4.4.1.8).

Como se usa en la presente memoria, cistationina β -liasa incluye péptidos de cistationina β -liasa (EC 4.4.1.8), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de cistationina en homocisteína. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de cistationina β -liasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo, algunos péptidos de cistationina β -liasa aceptarán otros sustratos además de la cistationina. Por lo tanto, se incluyen también dichos péptidos de cistationina β -liasa no específicos. Las secuencias de péptidos de cistationina β -liasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los n° de acceso a GenBank NZ_AAWW01000001, NC_006958 y NZ_AAVY01000004 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de cistationina β -liasa y los n° de acceso a GenBank: NP_746463, YP_226552 y NP_417481 dan a conocer secuencias de péptido de cistationina β -liasa. Son bien conocidos en la materia ensayos para caracterizar la actividad de cistationina β -liasa de un péptido particular. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito en Methods in Enzymology, 143: 483-486, 1987, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Se hace también referencia en la presente memoria a los genes que codifican péptidos de cistationina β -liasa como *metC*.

I. Homocisteína a metionina

Los hospedadores de producción pueden genomaniplarse usando polipéptidos conocidos para producir metionina, o sobreproducir metionina. Es un procedimiento de aumento de la producción de productos tales como metionina o SAME en la ruta biosintética de metionina mediante sobreexpresión o expresión de una forma más activa de péptidos de homocisteína metilasa (EC 2.1.1.14 y 10 2.1.1.13).

Como se usa en la presente memoria, la 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. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de homocisteína metilasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de homocisteína metilasa aceptarán otros sustratos además de la homocisteína. Por lo tanto, se incluyen también dichos péptidos de homocisteína metilasa no específicos. Las secuencias de péptido de homocisteína metilasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los nº de acceso a GenBank: NC_004129, NC_006958 y NC_000913 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de homocisteína metilasa y los nº de acceso a GenBank: AP_004520, YP_225791 y CAK16133 dan a conocer secuencias de péptido de homocisteína metilasa. Son bien conocidos en la materia ensayos para caracterizar la actividad de homocisteína metilasa de un péptido particular. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito en *Analytical Biochemistry*, 228, 323-329, 1995, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Se hace también referencia a los genes que codifican homocisteína metilasa en la presente memoria como *metH* o *metE*.

J. Metionina a S-adenosilmetionina

Los hospedadores de producción pueden genomanipularse usando polipéptidos conocidos para producir S-adenosilmetionina (SAME), o sobreproducir SAME. Es un procedimiento de aumento de la producción de productos en la ruta biosintética de metionina mediante sobreexpresión o expresión de una forma más activa de péptidos de metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6). Un especialista en la materia apreciará que, en casos en que la metionina es el producto deseado, puede atenuarse la actividad o expresión de péptidos de metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6) codificada por *metK*.

Como se usa en la presente memoria, la 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. Adicionalmente, un especialista en la materia apreciará que algunos péptidos de metionina adenosiltransferasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de metionina adenosiltransferasa aceptarán otros sustratos además de la metionina. Por lo tanto, se incluyen también dichos péptidos de metionina adenosiltransferasa no específicos. Las secuencias de péptidos de metionina adenosiltransferasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los nº de acceso a GenBank: NC_002516, NC_006958 y NC_000913 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de metionina adenosiltransferasa y los nº de acceso a GenBank: NP_747070, CAI37180 y NP_600817 dan a conocer secuencias de péptido de metionina adenosiltransferasa. Son bien conocidos en la materia ensayos para caracterizar la actividad de metionina adenosiltransferasa de un péptido particular. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito en *Methods in Enzymology*, 94: 219-222, 1983, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Se hace referencia también a los genes que codifican péptidos de metionina adenosiltransferasa en la presente memoria como *metK*.

II. Genomanipulación de la cepa de producción para aumentar la producción de metionina

La producción de aspartato puede aumentarse usando cualquier procedimiento conocido en la materia. Por ejemplo, la producción de aspartato puede aumentarse aumentando la cantidad de oxalacetato producida por las células con varios enfoques diferentes (Gokam *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 188-95, 2001; Sánchez *et al.*, *Metabolic Eng.*, 8: 209-226, 2006).

La producción de producto puede aumentarse también mediante la sobreexpresión de diversos genes en la ruta biosintética de L-metionina. Por ejemplo, genes tales como *metA*, *metB*, *metC*, *metE* y *metH*, *cysD*, *cysN*, *cysC*, *cysH*, *cysI*, *cysJ*, *cysK* y *cysM* pueden disponerse bajo el control de una variedad de promotores, permitiendo por tanto producir mayores cantidades de estas enzimas.

El gen *metA* codifica homoserina succiniltransferasa, que es la primera enzima de la ruta de biosíntesis de metionina a partir de homoserina y un punto de regulación para la producción de metionina. La proteína *metA* es una proteína termosensible de 186 residuos aminoácidos con una masa molecular calculada de 35,7 kDa. Es sabido que la actividad de *metA* se inhibe por los productos finales metionina y S-adenosilmetionina (Lee *et al.*, *J. Biol. Chem.* 241: 5479-5780, 1966). La inhibición por retroalimentación por estos dos productos es sinérgica, lo que significa que bajas concentraciones de cada metabolito solo son ligeramente inhibitorias, mientras que en combinación se ejerce una fuerte inhibición. Por tanto, una cepa de producción podría beneficiarse de una actividad de MetA resistente a la inhibición por retroalimentación.

Otro gen que puede atenuarse o eliminarse en la cepa de producción de metionina es *metJ*. El péptido codificado por *metJ* regula la expresión de varios genes implicados en la ruta de biosíntesis de metionina. La proteína codificada por *metJ* se une a S-adenosilmetionina y reprime los genes *metA*, *metC* y *metF*.

La proteína codificada por el gen *metF*, 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa, está implicada en la síntesis de N(5)-metiltetrahidrofolato, que es un donante de grupo metilo para la producción de L-metionina a partir de homocisteína (Sheppard *et al.*, *J. Bacteriol.* 181: 718-25, 1999). El documento US 2002/0049305 da a conocer que la producción de L-metionina puede mejorarse aumentando la expresión de 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (*metF*) en *Corynebacteria*. En consecuencia, los microorganismos genomanipulados descritos en la presente memoria pueden genomanipularse también para aumentar la producción de *metF*.

La modulación del gen *metK* puede aumentar también la producción de metionina y SAME. La S-adenosilmetionina (SAME) es el donante de grupo metilo principal en todos los organismos y está implicada en la biosíntesis de poliamina. SAME es también conocida como metionina adenosiltransferasa (MAT o MetK, EC 2.5.1.6). MetK cataliza la única ruta conocida para la biosíntesis de SAME. Se escinde la cadena de tripolifosfato completa del ATP y se forma el compuesto de sulfonio.

La formación de SAME disminuye la concentración de metionina y reduce la actividad de la ruta biosintética de metionina a través de la inhibición de la retroalimentación por MetA. Por ello, eliminar funcionalmente o atenuar *metK* puede aumentar la producción de metionina.

Un especialista en la materia apreciará que la eficacia de la utilización de azufre por cualquier célula que prepare metionina es importante. Esto es especialmente cierto para microorganismos que utilizan fosfoadenilil sulfato (PAPS) como intermedio durante la asimilación de azufre, porque el PAPS requiere el gasto de una molécula de ATP.

El sulfato es bastante poco reactivo y debe convertirse en primer lugar en una forma más reactiva para usarse por la célula. En *E. coli*, el sulfato se incorpora a la célula mediante un sistema de transporte periplasmático compuesto por tres componentes de membrana citoplasmática y una proteína de unión específica de sustrato localizada en el espacio periplasmático. Los tres componentes de membrana de la sulfato permeasa se codifican por los genes *cysT*, *cysW* y *cysA* (locus *cysA*). Los productos del locus *cysA* se regulan de acuerdo con el resto de la ruta de asimilación de sulfato como parte del regulón *cys*. Se activa entonces el sulfato acoplado con un nucleósido para preparar fosfosulfatos de nucleósido de alta energía a través de una ruta que parece ser similar en la mayoría de organismos.

Como se muestra en a FIG. 6, un microorganismo tal como *E. coli* utiliza una ruta que convierte el sulfato en adenilil sulfato (APS) usando un péptido de adenilil sulfato transferasa (EC 2.7.7.4 codificada por *cysNcysD*). Se convierte entonces el APS en PAPS por la APS cinasa (EC 2.7.1.25 codificada por *cysC*). Esta etapa requiere un ATP. Se convierte PAPS en sulfito por una PAPS reductasa (EC 1.8.4.8 codificada por *cysH*) y se reduce el sulfito a sulfuro por NADPH-sulfito reductasa (EC1.8.1.2 codificada por *cysJcysKcysG*). La ruta alternativa, mostrada en el lado derecho de la FIG. 6, convierte el APS directamente en sulfito usando una adenilil sulfato reductasa (EC1.8.9.92 o 1.8.4.9). Un especialista en la materia apreciará que funcionará cualquier adenilil sulfato reductasa que pueda convertir APS en sulfito. Por ejemplo, la adenilil sulfato reductasa de *Bacillus subtilis* (número de acceso CAA04409), o de *Pseudomonas aeruginosa* (número de acceso NP_250447).

Las secuencias de ácido nucleico que codifican adenilil sulfato reductasa pueden introducirse en cualquier microorganismo usado para producir metionina. Por ejemplo, las cepas descritas en la presente memoria, así como las cepas descritas en los documentos WO2005/108561 y WO2006138689 de Metabolic Explorer, y aquellas descritas por Kumar y Gomes, *Biotechnology Advances* 23: 41-61, 2005, pueden beneficiarse de la ruta dada a conocer que evita PAPS y requiere por tanto una molécula de ATP menos para la asimilación de sulfato.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Múltiples rutas de producción de metionina, una de las cuales utiliza sulfhidrilación directa, que usan secuencias de ácido nucleico expresadas exógenamente

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

Como se describe anteriormente, la producción endógena de metionina en *E. coli* sucede principalmente mediante la reacción de transulfuración. Este ejemplo describe la genomanipulación de *E. coli* para aumentar la sulfhidrilación directa manteniendo también la ruta de *metABC* endógena.

Se aumentó la sulfhidrilación directa clonando O-succinil sulfhidrilasa (EC 4.2.99.-), que convierte O-succinilhomoserina en homocisteína mediante reacción con sulfuro de hidrógeno. Esta enzima se codifica por *metZ* y puede encontrarse en algunas especies de *Pseudomonas* (Vermeij y Kertesz, *J. Bacteriol.* 181: 5833-5837, 1999 e Inoue *et al.*, *J. Bacteriol.* 179: 3956-3962, 1997).

Más específicamente, se clonó *metZ* de *Pseudomonas aeruginosa* en auxótrofos de metionina de la cepa TF4076BJF, que derivaba 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, descrito adicionalmente en el ejemplo 3 siguiente). Estos auxótrofos tienen la delección de cualquiera de los genes *metB* o *metB* y *metC*. *metZ* de *Pseudomonas aeruginosa* potenciaba el crecimiento de los mutantes de delección de *metB* y *metBC* en medio mínimo. Aunque en cultivos de matraz no se recuperó totalmente la producción de metionina, la expresión de *metZ* induce la producción de metionina hasta ~100 mg/l en el mutante de delección de *metBC*, como se muestra en la Tabla 1. Esto indica que *metZ* es responsable de la producción de homocisteína en la célula.

La baja producción de metionina de los mutantes de delección transformados con *metZ* puede ser debida a la limitación del sulfuro en la fracción intracelular (se proporcionan a continuación procedimientos para aumentar la concentración de sulfuro). Esto está apoyado por el descubrimiento de que el crecimiento de la cepa de delección de *metBC* transformada con *metZ* estaba potenciado en medio M9 en presencia de sulfuro de sodio 2 mM. En ensayos

in vitro, la O-succinilsulfhidrilasa tenía una baja afinidad por sulfuro. Mediante evolución dirigida, es posible desarrollar O-succinilsulfhidrilasas mejoradas con mayor afinidad por sulfuro y también mayor actividad. Una O-succinilsulfhidrilasa altamente activa podría reemplazar a *metB* y *metC* en la ruta de metionina, o podría complementar la ruta para aumentar el flujo de carbono a la metionina.

5 [Tabla 1]

Complementación del crecimiento y producción de metionina en TF4076BFJ- Δ ABC

TF4076BFJ- Δ ABC	DO	Glucosa usada (g/l)	Intermedio met (mg/l)		GA y HS (g/l)	
			OSH	Met	HS	GA
Vector vacío	2,5	10,0	3867	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* de *Pseudomonas aeruginosa* en el vector pProLar (ClonTech)

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

Este ejemplo muestra la producción de metionina simultánea a partir de dos rutas en *E. coli*. Una ruta es la ruta de *metABC* endógena y la segunda ruta permite la sulfhidrilación directa mediante la expresión de *metY* y *metX* de diversos organismos.

15 Como se muestra en la FIG. 1, *E. coli* produce metionina endógenamente usando los genes de la ruta de transulfuración *metA*, *metB* y *metC* pasando por OSHS. Se usó genomanipulación para añadir una ruta adicional a *E. coli* mediante clonación y expresión de los genes *metX* y *metY* en *E. coli*, que dieron como resultado un organismo hospedador que prepara metionina tanto mediante transulfuración como sulfhidrilación directa simultáneamente.

20 Los genes *metY* y *metX* usados para construir la ruta heteróloga se clonaron a partir de ADN de *Leptospira meyeri*, *Deinococcus radiodurans*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Brevibacterium linens*, *Nostoc punctiforme* y *Pseudomonas aeruginosa* como se describe a continuación, y se construyeron varias cepas diferentes para analizar el impacto de la adición de estos genes sobre la producción de metionina. Se clonaron y ensayaron también la homocisteína sintasa de *Corynebacterium glutamicum* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se demostró que ambas rutas funcionan simultáneamente y se mejoró la producción de metionina con esta adición.

25 Para evaluar si las enzimas de *metX* y *metY* de *L. meyeri* podían complementar el crecimiento de un auxótrofo de metionina de *E. coli*, se amplificó el agrupamiento génico *metYX* de *L. meyeri* del plásmido *metXY*-pCR2.0-TOPO y se clonó en el vector pPRO-Nde-del. Se inició la transcripción de los genes *metYX* en este plásmido mediante un promotor *lac/ara* localizado en el vector.

30 Se evaluaron cuatro cepas de *E. coli* incluyendo W3110 Δ *metA* (producción detenida de OSHS), TF4076BJF (producción aumentada de homoserina), TF4076BJF Δ *metA* (producción detenida de OSHS) y TF4076BJF Δ *metAmetB* (producción detenida de OSHS y cistationina a partir de OAHs o OSHS). La cepa TF4076BJF es un auxótrofo de treonina, desregulada para la producción de metionina con un aumento del flujo de carbono hacia homoserina, que es capaz de producir metionina mediante la ruta natural de *E. coli*.

35 Se transformaron las cepas con el vector de clonación y se plásmido que contiene *metYX*, respectivamente. Se sembraron en estrías entonces los transformantes sobre placas de medio mínimo M9 que contiene glucosa (2 g/l), isoleucina (0,15 g/l), treonina (0,3 g/l), kanamicina (50 mg/l) e IPTG. El agrupamiento génico *metYX* de *Leptospira meyeri* complementaba el crecimiento de W3110 Δ *metA* a las 24 horas. La cepa W3110 Δ *metA* que expresa solo *metX* no era capaz de crecer en la placa de medio mínimo M9. Por lo tanto, W3110 de *E. coli* carece de una enzima eficaz para usar O-acetil-L-homoserina como precursor de la biosíntesis de metionina. La cepa W3110 Δ *metA* transformada con el vector vacío de control, pPRO-Nde-del como se describe en el documento W02006113897, no crecía al cabo de 48 horas. La cepa TF4076BJF crecía sobre las placas de medio mínimo cuando se transformaba con el vector de clonación o el plásmido que contenía *metYX* de *L. meyeri*.

Se ensayó también en genes alternativos de *metYX* la complementación del crecimiento en medio mínimo. En la clonación de los genes *metYX* de *D. radiodurans*, *C. aurantiacus*, *B. linens* y *N. punctiforme*, se acopló la traducción del gen *metX* con la traducción del gen *metY* iniciada por un rbs localizado en el vector, debido a la ausencia de un sitio de unión ribosómico (rbs) de *E. coli* eficaz adyacente al gen en dirección 3', *metX*.

- 5 Los agrupamientos génicos *metYX* de *L. meyeri*, *D. radiodurans* y *C. aurantiacus* fueron los más eficaces en la complementación del crecimiento de las cepas auxotróficas de metionina. Se observó también la complementación del crecimiento en auxótrofo de metionina cuando se reemplazó *metY* (*L. meyeri*) por *metY* (*P. aeruginosa*) en el agrupamiento génico *metYX* de *L. meyeri*. Estas células mostraron una tasa de crecimiento relativo reducida respecto al mismo auxótrofo de metionina que expresa *metYX* de *L. meyeri*.
- 10 Se determinó la producción de metionina usando el protocolo de matraz agitado descrito en el ejemplo 3. Brevemente, se hicieron crecer cultivos a 30 °C durante 50 horas en medio suplementado con metionina 150 mg/l (para mejorar el crecimiento inicial) y se midió la metionina por HPLC. La Tabla 2 muestra que la producción de metionina era mayor en las cepas que portaban ambas rutas en comparación con aquellas donde estaba disponible solo la transulfuración o la sulfhidrilación directa.

15 **[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> (<i>Lm</i>)	10,2	36,5	984
TF4076BJF <i>metY</i> (<i>Pa</i>) <i>metX</i> (<i>Lm</i>)	9,2	29,1	299
TF4076BJF <i>metYX</i> (<i>Dr</i>)	8,8	40,0	510
TF4076BJF <i>metYX</i> (<i>Ca</i>)	12,1	40,0	740
TF4076BJF Δ <i>metA</i> <i>metYX</i> (<i>Lm</i>)	5,8	23,6	368
TF4076BJF Δ <i>metA</i> <i>metY</i> (<i>Pa</i>) <i>metX</i> (<i>Lm</i>)	6,6	21,1	79
TF4076BJF Δ <i>metAB</i> <i>metYX</i> (<i>Lm</i>)	6,2	23,7	280
TF4076BJF Δ <i>metAB</i> <i>metYX</i> (<i>Dr</i>)	6,6	32,6	140

20 Los genes *metA* y *metB* son necesarios para la síntesis de metionina en cepas de *E. coli*. Cuando cualquiera 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 era en algunos casos más del doble cuando ambas rutas están disponibles para la célula. Estos resultados demuestran que las rutas no son mutuamente excluyentes y que la homoserina se convierte en metionina por ambas rutas.

25 Para demostrar adicionalmente los beneficios de una ruta dual, se compararon las cepas en recipientes de fermentación de 5 l 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 la alimentación. La enzima codificada por el gen *metY* de la mayoría de organismos se inhibe por retroalimentación a altas concentraciones de metionina. En algunos casos, la enzima codificada por el gen *metX* se inhibe también por retroalimentación. Como resultado, se observó una acumulación significativa de homoserina y OAHS en estas fermentaciones. Se muestra en la FIG. 2 una comparación de la producción de metionina en fermentadores y se resumen los datos en la Tabla 3. Estos resultados confirmaban la observación realizada en los matraces de que la producción de metionina podía potenciarse significativamente mediante la adecuada expresión de una ruta de sulfhidrilación directa heteróloga, y que esta ruta podía ser responsable de la mayoría de la producción de metionina si las enzimas se expresaban apropiadamente.

35

[Tabla 3]**Expresión heteróloga de la ruta de sulfhidrilación directa**

Cepa	Acumulación de metionina g/l	Acumulación de O-acetilhomoserina (g/l)
TF4076BJF	2,1	-
TF4076BJF <i>metYX(Lm)</i>	4,7	7,7
TF4076BJF <i>metY(Pa)metX(Lm)</i>	1,5	20,0
TF4076BJF <i>metYX(Dr)</i>	4,7	32,4
TF4076BJF <i>metYX(Ca)</i>	4,9	20,7
TF4076BJF Δ <i>metA metYX(Lm)</i>	4,1	6,2

- 5 Para aumentar el flujo de productos hacia metionina, pueden usarse *metY* y a *metX* que son resistentes a inhibición por retroalimentación. También es posible regular al nivel de expresión de *metX* y la expresión de *metH* para conducir la homoserina más rápidamente hacia metionina.

Las diferencias en la producción de metionina indican que la ruta de *metXY* es altamente eficaz en *E. coli* y que la ruta de *metXY* añadida a una cepa desregulada tal como esta da como resultado una acumulación de metionina de más del doble.

10 **Ejemplo 2: Homocisteína sintasa que utiliza O-acetil-L-homoserina (OAHS) u O-succinil-L-homoserina (OSHS)**

15 Este ejemplo describe procedimientos usados para aislar una homocisteína sintasa codificada por *metY* a partir de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 47085). Esta enzima se inhibe tanto por L-metionina como por S-adenosil-L-metionina. Se analizó la actividad enzimática según Yamagata, *Methods in Enzymology*, 143: 478, 1987. El procedimiento estaba ligeramente modificado en que se tomaron múltiples puntos de muestra, se usó guanidina para inactivar la reacción y se detectó la formación de homocisteína usando DTNB ((ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) Sigma D8130) como en el análisis de *metA* descrito en el ejemplo 3.B. Se definió una unidad enzimática (U) como la formación de un μ mol de homocisteína por minuto a temperatura ambiente

20 Se expresó MetY a partir de *P. aeruginosa* y se analizó usando 17,5 μ g de proteína purificada (marcada en N). En contraposición con *metY* de *L. meyeri* y con la mayoría de las demás homocisteína sintasas publicadas, esta enzima era activa tanto con acetilhomoserina como succinilhomoserina. La actividad era similar para ambos sustratos, se inhibía por retroalimentación por metionina y SAME y el nivel de inhibición por retroalimentación parecía ser ligeramente menor cuando era OSHS el sustrato. Se observó cierta inhibición con metionina 1 mM. Con OAHS como sustrato a 10, 50 y 100 mM, la enzima retenía aproximadamente un 50, 19 y 9 %, respectivamente, de la actividad que tenía en ausencia de metionina. La actividad en presencia de SAME 5 y 10 mM era aproximadamente un 72 y 21 % de la actividad original. Cuando era OSHS el sustrato, la actividad caía un 53 y 31 % en presencia de metionina 50 y 100 mM y un 86 y 19 % en presencia de SAME 5 y 10 mM.

25 **Ejemplo 3: Procedimientos de genomanipulación de cepas hospedadoras para aumentar la producción de metionina**

30 Además de añadir rutas biosintéticas de metionina a organismos hospedadores como se describe anteriormente en el ejemplo 1, el organismo hospedador puede genomanipularse adicionalmente para reducir la inhibición de la ruta biosintética de metionina, aumentar la disponibilidad del reactante y/o reducir el catabolismo del producto.

A. Inactivación del represor global de metionina y treonina cinasa junto con expresión aumentada de 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa para aumentar la producción de metionina

35 Es un procedimiento de preparación de la cepa de producción de metionina modificar una cepa que ya se ha genomanipulado para producir un aminoácido, tal como treonina. Por ejemplo, puede usarse la cepa productora de treonina TF 4076, descrita en la publicación de patente coreana nº 92-8365 (KFCC 10718), aunque es un auxótrofo de metionina. Las cepas ejemplares adicionales incluyen aquellas depositadas en la ATCC (13070, 13071, 21148, 21149, 21150, 21151, 21272, 21277, 21278, 21318, 21319, 21320), que se describen como sobreproductoras de treonina.

40 Usando la cepa TF 4076 como punto de partida, se potenció la producción de metionina eliminando el gen *thrB* para evitar la producción de treonina y eliminando el gen *metJ* para liberar la represión de la expresión de la ruta biosintética de metionina. Se modificó también la cepa para sobreexpresar el gen *metF*.

Delección de thrB

Se eliminó *thrB* usando un módulo de loxP-cloranfenicol (loxP-Cm) (Gene 2000 vol. 247, p255-264). Se clonó el gen *thrB* por PCR usando las secuencias cebadoras 1 y 2 (SEQ ID NO: 5 y 6) usando el cromosoma de K12 de *E. coli* como molde. Se usaron condiciones de PCR de 94 °C durante 30 segundos, entonces 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 en gel los productos de PCR, se clonaron en el kit de clonación pCR2.1-topo (Invitrogen, EE.UU.) y se denominaron pCR-*thrB*. Se digirió pCR-*thrB* usando pflMI y se insertó el módulo loxP-Cm. A partir de este plásmido, se amplificó por PCR el gen *thrB* que contiene el módulo loxP-Cm usando los cebadores 1 y 2 (SEQ ID NO: 11 y 12). Se purificaron en gel los productos de PCR. Se sometieron a electroporación los fragmentos de PCR en la cepa TF4076, se seleccionaron las colonias resistentes a cloranfenicol y se confirmó la delección de *thrB*. Se retiró el marcador de cloranfenicol de una colonia identificada y se denominó la cepa final obtenida TF4076B. Esta cepa no crecía en medio mínimo M9 (DIFCO) sin treonina, indicando que esta cepa es auxótrofa de treonina.

1. *thrB* SEQ ID NO: 11

15 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

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

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

5'-atggctgaat ggagcggcga atatatcagc ccatagctg agcacggcaa ggtgtaggct
ggagctgctt c-3'

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

5'-gtattccac gtctccgggt taatcccat ctcacgatg atctccat gaatacctc cttag-3'

5. *metJ* SEQ ID NO: 15

5'-gggctttgct ggtgaaatg-3'

6. *metJ* SEQ ID NO: 16

35 5'-actttgcat gagcgagag-3'

Integración de metF

Para complementar la auxotrofia de metionina de TF4076BJ, se expresó el gen *metF* en la cepa TF4076BJ. Se amplificó el gen *metF* usando las secuencias cebadoras 7 y 8 (SEQ ID NO: 17 y 18) y el cromosoma de la cepa K12 de *E. coli* como molde. Se usaron condiciones de PCR de 94 °C durante 30 segundos, entonces 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto y entonces 72 °C durante 7 minutos y premezcla de PCR HL (Bioneer Co., Corea). Se eluyeron en gel los fragmentos de PCR y se insertaron en los sitios *NheI* y *Sad* en el vector pSE380 (Invitrogen Co.). Se denominó el plásmido pSE380-*metF*. Se transformó pSE380-*metF* en la cepa TF4076BJ. El transformante crecía en medio mínimo M9 (Difco) que contenía treonina e isoleucina, indicando la complementación de la auxotrofia de metionina.

Se determinó el nivel de expresión del gen *metF* bajo el control de dos promotores diferentes. Los promotores eran el promotor pCJ1 (documento PCT/KR2005/004338) y el promotor pThreonine. Se amplificó el gen *metF* usando las secuencias cebadoras 9 y 10 (SEQ ID NO: 19 y 20) y el cromosoma de la cepa K12 de *Escherichia coli* como molde. Se usaron condiciones de PCR de 94 °C durante 30 segundos, entonces 25 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min y entonces 72 °C durante 7 min y premezcla de PCR HL (Bioneer Co., Corea). Se eluyeron los fragmentos de PCR en gel y se ligaron en los sitios *PvuII* e *HindIII* en el vector pCL1920 (Lerner e Inouye, *Nucleic Acids Research* 18: 4631, 1990) que contenía el promotor pCJ1 o el promotor pThreonine. Se amplificó por PCR el promotor pCJ1 usando las secuencias cebadoras 11 y 12 (SEQ ID NO: 21 y 22) y se amplificó el promotor pThreonine del cromosoma K12 de *E. coli* usando las secuencias cebadoras 13 y 14 (SEQ ID NO: 23 y 24). Se eluyeron en gel los fragmentos de PCR y se integraron en los sitios *KpnI* y *EcoRV* en el vector pCL1920. Las condiciones de PCR usadas fueron las mismas que anteriormente. El plásmido que contiene el gen *metF* bajo el control del promotor pCJ1r se denominó *pCL-pCJ1-metF* y el plásmido que contiene el gen *metF* bajo el control del promotor pThreonine se denominó pCL-pThr-metF. Se transformó cada plásmido en la cepa TF4076BJ y se midió la producción de metionina.

Se usó un protocolo de cultivo en matraz agitado para ensayar las cepas como sigue: se incubó un cultivo semilla a 31 °C durante 6 horas en medio consistente en (en 1 l): 10 g de extracto de levadura, 6 g de Na₂HPO₄·12H₂O, 0,5 g de NaCl, 3 g de KH₂PO₄, 2 g de glucosa, 0,49 g de MgSO₄·7H₂O, 0,015 g de CaCl₂·2H₂O. Se usó entonces para inocular matraces con el siguiente medio (1 l): 17 g de (NH₄)₂SO₄, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 2 g de extracto de levadura, 0,3 g de L-treonina, 10 mg de MnSO₄·7H₂O, 10 mg de FeSO₄·7H₂O, 10 mg de ZnSO₄, 30 g de CaCO₃, 40 g de glucosa y 2 g de KH₂PO₄ pH 7,2. Se incubaron los matraces durante 64 a 72 horas a 31 °C con agitación a 250 rpm. Después de la centrifugación, se aisló el sobrenadante de cultivo y se usó para análisis de metionina.

Para el cultivo de células que contienen el plásmido pSE380-*metF*, se añadió ampicilina 100 µg/l e IPTG 0,5 mM al medio. El gen *metF* bajo el control del promotor pCJ1 era el que producía más metionina como se muestra en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Producción de metionina en células que contienen diversos módulos de expresión de *metF*

	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-MetF	7,4	35	206
TF4076BJ/pCL-pthr-MetF	22	40	136

Para expresar el gen *metF* más establemente, se integraron genes *metF* bajo el control de promotores pTrc, pCJ1 y pThreonine en el locus *lacZ* del cromosoma de TF4076BJ. Se amplificó por PCR cada gen *metF* a partir de cada plásmido y se insertó en el sitio *NsiI* en el vector pBrint (Borgne *et al.*, *Gene* 223: 213-219, 1998). Se transformaron los vectores en la cepa TF4076BJ, se seleccionó un transformante que crecía en medio que contiene cloranfenicol a 37 °C y se confirmó la integración del gen *metF* en el locus *LacZ* del cromosoma. Se transformaron las colonias seleccionadas con pJW168 y se eliminó el marcador de cloranfenicol. No pudieron obtenerse células que contenían el gen pCJ1-*metF* y el transformante que contenía el módulo pThr-*metF* no crecía bien. Solo las células que contenían el gen pTrc-*metF* en el locus *LacZ* crecían bien. El cultivo en matraz de esta cepa mostró una producción de ~600 mg/l de metionina en presencia de IPTG 0,5 mM en el medio. La cepa final que contiene el gen pTrc-*metF* se denominó TF4076BJF y se analizó adicionalmente.

En resumen, se derivó la cepa TF4076BJF de la cepa TF4076 productora de treonina, que se modificó mediante 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'- GCT AGC c atgagcttttttcacgccag - 3'

8. metF SEQ ID NO: 18

5'- GAG CTC ttataaaccaggtcgaaccc - 3'

5 9. metF SEQ ID NO: 19

5'- CAGCTGatgagcttttttcacgccag- 3'

10. metF SEQ IDNO: 20

5'- AAGCTT ttataaaccaggtcgaaccc- 3'

11. promotor CJ1 SEQ ID NO: 21

10 5'- cgg ggt acc acc gcg ggc tta ttc cat tac at- 3'

12. promotor CJ1 SEQ ID NO: 22

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'

15 14. promotor de treonina SEQ ID NO: 24

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

Se hizo crecer la cepa TF4076BJF en fermentadores de 5 l según el protocolo descrito a continuación, y se obtuvo una producción de aproximadamente 2,2 g/l de metionina en 96 h.

20 Se efectuaron 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 jarras de 5 litros. Se hizo crecer el inóculo en 25 ml de medio consistente en 10,0 g de extracto de levadura, 4,49 g de Na₂HPO₄·7H₂O, 0,5 g de NaCl, 3,0 g de KH₂PO₄, 0,49 g de MgSO₄·7H₂O, 0,015 g de CaCl₂·2H₂O y glucosa 2 g/l en un volumen de 1 l. Se usaron 50 mg/l del antibiótico apropiado dependiendo de la resistencia de la cepa que se está ensayando. Después de incubar con agitación a 31 °C y 250 rpm durante 8 - 24 horas, se transfirió el cultivo a 200 ml del mismo medio y se
25 incubó en las mismas condiciones durante 16 a 20 horas. Se usó este cultivo para inocular fermentadores con 2,5 l de medio.

30 El medio de fermentación consistía en: (NH₄)₂SO₄ 17,0 g/l, extracto de levadura 2,0 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l, L-treonina 1 g/l, isoleucina 0,3 g/l, MnSO₄·H₂O 0,01 g/l, FeSO₄·7H₂O 0,01 g/l, ZnSO₄·7H₂O 0,01 g/l, MgSO₄·7H₂O 1 g/l, piridoxal 2 mg/l, vitamina B12 2 mg/l y glucosa 40 g/l. Se añadieron antibióticos e IPTG dependiendo de la cepa que se haga crecer. Se mantuvo la temperatura de fermentación a 31 °C, el oxígeno disuelto por encima del 30 % de saturación y se controló inicialmente el pH con NH₄OH al 28 %. Después de agotar la glucosa, el pH se elevó. En ese punto, se inició una alimentación fija continua, o se añadieron alícuotas de 100-150 ml de alimentación cada vez, basándose en los aumentos del pH. La alimentación consistía en extracto de levadura 4,0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 33 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, L-treonina 1,5 g/l, MgSO₄·7H₂O 1 g/l, vitamina B12 2 mg/l y glucosa 400 g/l. Se introdujeron algunas variaciones
35 menores en el medio y la alimentación dependiendo de la cepa. La fermentación prosiguió durante un total de 72 a 96 horas. Se midió la concentración de metionina a lo largo de la misma, así como el crecimiento celular por densidad óptica y la utilización de glucosa.

B. Generación de homoserina succiniltransferasas resistentes a retroalimentación para la producción de metionina

40 Se construyó una cepa de *E. coli* con los genes *metA* y *metB* eliminados. Esta cepa mostraba acumulación de homoserina debido a la pérdida de la actividad de MetA. Cuando se expresó el módulo *metA* de tipo silvestre en esta cepa, se produjo OSHS por la actividad de MetA en ausencia de metionina. Sin embargo, cuando se añadió metionina al medio, la cepa con el módulo *wt-metA* acumuló homoserina de nuevo debido a la inhibición por

retroalimentación de la actividad de MetA. Por tanto, los genes *metA* resistentes a retroalimentación pueden identificarse ensayando la acumulación de O-succinilhomoserina en presencia de metionina. El mutante productor de más OSHS en presencia de una alta cantidad de metionina en el medio contiene el *metA* más resistente a la inhibición por retroalimentación.

- 5 Se proporciona en la FIG. 3 una representación esquemática de la metodología de cribado.

Construcción del mutante de delección de metB

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

- 15 15. *metB* + cloranfenicol SEQ ID NO: 25

5'-TTACTCTGGT GCCTGACATT TCACCGACA AAGCCCAGGG
AACTTCATCA Cgtgtaggct ggagctgctt c -3'

16. *metE* + cloranfenicol SEQ ID NO: 26

5'-TTACCCCTTG TTTGCAGCCC GGAAGCCATT TTCCAGGTCG
GCAATTAAT Tcatatgaat atcctcctta g -3'

Construcción del mutante de delección de metA

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

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

5'-
CAATTTCTTGCGTGAAGAAAACGTCTTTGTGATGACAACCTTCTCGT
GCGTgtgtaggctggagctgcttcc -3'

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

5'-
AATCCAGCGTTGGATTCATGTGCCGTAGATCGTATGGCGTGATCTG
GTAGcatatgaatcctccttag-3'

Construcción de un vector de expresión de metA

35 Para preparar una colección de *metA*, se construyó un vector de expresión de *metA*. Se amplificó el gen *metA* usando las secuencias cebadoras 19 y 20 (SEQ ID NO: 29 y 30) con el cromosoma de la cepa K12 de *E. coli* como molde. Se usaron condiciones de PCR de 94 °C durante 30 segundos, 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto y entonces 72 °C durante 7 minutos y premezcla de PCR HL (Corea, Bioneer Co.). Se eluyeron en gel los fragmentos de PCR y se ligaron en pCL1920 en el sitio *SmaI*. Se denominó el plásmido pA-CL. Se transformó el plásmido pA-CL en la cepa TF4076BJF-AB y se efectuó el cultivo en

matraz con y sin metionina. Se midieron OSHS y homoserina mediante el mismo procedimiento que se describe anteriormente para la metionina. Como se muestra en la Tabla 6, las células que contienen el plásmido pA-CL en ausencia de metionina producían OSHS 3,8 g/l con homoserina 0,24 g/l. Sin embargo, en presencia de metionina 1 g/l, las células producían OSHS 5,8 g/l con homoserina 4,9 g/l. El aumento de la cantidad de OSHS es debido al aumento del crecimiento por la adición de metionina, mientras que el aumento de homoserina es debido a la inhibición por retroalimentación de la actividad de *metA* por la metionina.

[Tabla 6]

Producción de O-succinilhomoserina y homoserina en la cepa TF4076BJF-AB que contiene el 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 /pCl1920	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 /pCl1920	4,7	39,8	0	5,7
1 g/l	TF4076BJF-AB /pA-CL	6,4	37,4	5,9	4,9

10 19: *metA* SEQ ID NO: 29

5'-aatgatccTGCCGTGAGCGGCGAATAC-3'

20: *metA* SEQ ID NO: 30

5'-agctctagaCTGCTGAGGTACGTTTCGG-3'

Construcción de la colección de mutantes de pA-CL

15 Para preparar una colección de mutantes de pA-CL, se efectuó una PCR con tendencia a error. Se realizó la PCR con tendencia a error usando las secuencias cebadoras 21 y 22 (SEQ ID NO: 31 y 32) con el plásmido pA-CL como molde. Se usaron condiciones de PCR de 94 °C durante 30 segundos, 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 2 minutos y entonces 72 °C durante 7 minutos y el kit de mutagénesis por PCR BD Diversify (BD, EE.UU.). Se digirieron los fragmentos de PCR con *Bam*HI y *Xba*I y se ligaron en pCL1920.

20 Se transformó la colección en la cepa TF4076BJF-AB y se recogieron ~30.000 transformantes para análisis adicional.

21: pCL1920 SEQ ID NO: 31

5'-CGAAGTAATCGCAACATCCG-3'

22: pCL1920 SEQ ID NO: 32

25 5'-GTCTGCTATGTGGTGCTATC-3'

Preparación de extracto bruto de enzima MetB

Para medir el OSHS mediante un procedimiento enzimático, se usó la enzima MetB de *E. coli*. La enzima MetB reacciona con OSHS y cisteína en relación 1:1 y produce cistationina. El reactivo DTNB (ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) Sigma D8130) reacciona con el grupo SH libre de la cisteína y da un color amarillo que puede medirse a 415 nm. Antes de la reacción con MetB, la cisteína reacciona con DTNB y se vuelve de color amarillo.

30 Después de la reacción con MetB, la cisteína se vuelve cistationina, que no puede unirse a DTNB. Mediante la reducción de la DO a 415 nm después de la reacción puede medirse la cantidad de OSHS en la mezcla de reacción.

Para la sobreexpresión de enzima MetB, se digirió con *Bam*HI y *Hind*III el gen *metB* amplificado por PCR a partir del cromosoma de K12 de *E. coli* y se clonó en el vector pCDF-Duet (Novagene, EE.UU.). Se efectuó una reacción PCR usando las secuencias cebadoras 23 y 24 (SEQ ID NO: 33 y 34) y el cromosoma de K12 de *E. coli* como molde. Se usaron condiciones de PCR de 94 °C durante 30 segundos, 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto y entonces 72 °C durante 7 minutos y premezcla HL (Bioneer, Corea). Se transformó el plásmido que contiene el gen *metB* en *E. coli* usando una célula Tuner (Novagen, EE.UU.) y se hizo crecer el transformante durante una noche en medio LB que contenía espectinomicina 50 µg/ml. Se diluyó el caldo de cultivo de una noche en medio LB que contenía espectinomicina 50 µg/ml y se incubó a 37 °C hasta que alcanzó

una DO a 600 nm de 0,6, en cuyo punto se añadió IPTG a una concentración final de 0,2 mM y se incubó el cultivo durante 4 horas a 30 °C. Se recogieron las células mediante centrifugación a 12.000 rpm, se resuspendieron en tampón fosfato de potasio 0,1 M (pH 7,5) y se fragmentaron mediante sonicación (5 x 30 segundos). Se consiguió extracto celular bruto por centrifugación durante 20 min a 12.000 rpm y se usó entonces el sobrenadante para el ensayo enzimático.

23: metB SEQ ID NO: 33

5'-gccaggatccgATGACGCGTAAACAGGCCAC-3'

24: metB SEQ ID NO: 34

5'-ccgcaagcttTTTACCCCTTGTTTGCAGCC-3'

10 Cribado de *metA* resistente a retroalimentación

Se identificaron las mutaciones de *metA* resistentes a retroalimentación inoculando la cepa TF4076BJF-AB que contiene mutantes de pA-CL en placas de 96 pocillos que contienen medio de microfermentación y cultivando durante 48 h a 31 °C con agitación. El medio de microfermentación es 1 volumen de medio de matraz agitado como se describe en el ejemplo 3 y 1 volumen de tampón fosfato de potasio 0,05 M pH 6,5, con L-metionina 5 g/l.

15 Se centrifugaron entonces las placas de 96 pocillos durante 10 min a 3.000 rpm y se midió el OSHS en el sobrenadante mediante el procedimiento enzimático descrito anteriormente (Preparación del extracto bruto de MetB). Se mezclaron 50 µl del sobrenadante de 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 + PLP (5'-fosfato de piridoxal hidratado, Sigma P9255) 10 mM 1/500 + extracto bruto de MetB 1/100 (5 mg/ml)). Se incubó la reacción durante 10 minutos a 37° C.

20 Se 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. Se seleccionaron una o dos colonias que mostraban la menor absorbancia a 415 nm de cada placa de 96 pocillos y se sembraron en estrías sobre medio LB que contenía espectinomicina 50 µg/ml. Se inocularon las colonias resultantes sobre otra placa de 96 pocillos que contenía medio de microfermentación y se efectuó una segunda ronda de cribado. Se ensayaron entonces las cepas seleccionadas en las condiciones de cultivo en matraz agitado descritas anteriormente con la adición de metionina 5 g/l al medio, y se midió la producción de O-succinilhomoserina.

25

Se seleccionaron 24 mutantes de las 12.000 colonias para cultivo en matraz y se seleccionaron 14 mutantes para secuenciación. A partir de estos, se identificaron 5 nuevos mutantes. Los otros 9 mutantes restantes poseían las mismas mutaciones que se habían reseñado anteriormente. Se muestra en la Tabla 7 la acumulación de OSHS y homoserina en el cultivo de matraz agitado para los 14 mutantes, y se muestran en la Tabla 8 los cambios de aminoácido en las secuencias de *metA* de los mutantes seleccionados.

30

[Tabla 7]

Rendimiento en matraz agitado 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-Cl)	6,0	40	4,9	5,5
Nº 7	4,9	40	9,2	2,9
Nº 8	4,6	40	5,4	3,8
Nº 10	4,7	40	8,8	3,0
Nº 11	4,7	40	9,1	2,8
Nº 32	5,8	40	10,7	1,6
Nº 34	5,6	40	10,1	2,4
Nº 36	5,6	40	10,4	2,2
Nº 37	5,9	40	9,6	1,6
Nº 39	7,0	40	9,2	1,0
Nº 22	4,8	40	9,4	1,4

Nº 23	4,6	40	9,6	1,4
Nº 41	5,6	40	11,8	2,1
Nº 43	6,1	40	11,2	2,3
Nº 47	6,0	40	11,2	2,2
Nº 49	5,6	40	11,5	2,1

[Tabla 8]

Análisis de secuencia de mutantes seleccionados

Posición	Wt	32 SEQ ID NO 2	37 SEQ ID NO 4	10 SEQ ID NO 6	11 SEQ ID NO 8	42 SEQ ID NO 10
24	T		S (A70T)			
29	S				P (T85C)	
79	N					S (236G)
114	E				G (A341G)	
140	F				S (T419C)	I (T418A)
163	K	Q (A487C)				
222	F	L (T666A)				
275	A		E (C824A)			
290	N			H (A868C)		
291	N					N (T871A)
295	Q	R (A884G)				
297	T		A (A889G)			
304	M					L (A910T)
305	N		Y (A913T)			
Sin cambio de aminoácido		A105G, A597T	C222T	T450C	T915C	T573C

5 *Resistencia a la retroalimentación de metA mutante*

Puesto que todas las *metA* resistentes a la inhibición por retroalimentación producían cantidades similares de OSHS en presencia de metionina 5 g/l en el cultivo en matraz, se añadieron mayores concentraciones de metionina al medio de cultivo en matraz y se determinó la producción de OSHS. Después de 64 h de cultivo con L-metionina 30 g/l se redujo la producción de OSHS solo en la muestra mutante nº 37, y todas las demás mostraron niveles de producción de OSHS similares que en presencia de metionina 5 g/l. Estos resultados, presentados en la Tabla 9, indicaban que las *metA* resistentes a la inhibición por retroalimentación eran resistentes a concentraciones de metionina del orden de 30 g/l.

10

[Tabla 9]**Producción de OSHs de *metA* mutantes en presencia de metionina 30 g/l**

Cepa	DO	Glucosa usada (g/l)	Producción de OSH (g/l)	Producción de HS (g/l)
Control (TF4076BJF-AB/pA-Cl)	4,36	38,6	2,7	1,1
Nº 10	3,3	33,1	10,6	0,44
Nº 11	3,5	36,6	11,5	0,22
Nº 32	3,1	30,2	10,7	0,23
Nº 37	2,0	22,0	6,2	0,05
Nº 41	44	40,0	10,5	No analizado

Caracterización in vitro de proteínas metA mutantes

- 5 Se usó PCR para amplificar y después clonar los 5 genes mutantes de *metA* identificados como pCL-A nº 10, pCL-A nº 11, pCL-A nº 32, pCL-A nº 37 y pCL-A nº 41 en el vector pET30a. Se sometieron todos los constructos a análisis de secuencia de ADN para confirmar la presencia de mutaciones. Se clonaron los genes con un marcador de His C-terminal para purificación enzimática. Se sobreexpresaron las enzimas, se purificaron y se midió la actividad en presencia de diferentes niveles de metionina y SAME, como se describe por Lawrence, J. *Bacteriol.*, 109: 8-11, 1972.
- 10 Las únicas modificaciones del ensayo fueron que se tomaron múltiples puntos 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 por retroalimentación en comparación con la enzima de tipo silvestre, y que los mutantes nº 10 y nº 11 eran los más resistentes tanto a inhibición por metionina como por SAM.

[Tabla 10]**15 Caracterización de enzimas MetA mutantes y de tipo silvestre**

Actividad específica	Wt	Nº 10	Nº 11	Nº 32	Nº 37	Nº 41
(U/mg)*		SEQ ID NO 6	SEQ ID NO 8	SEQ ID NO 2	SEQ ID NO 4	SEQ ID NO 10
Control	386	176	479	276	228	315
Con Met 100 mM	29	172	451	218	190	232
Con Met 300 mM	-	125	282	-	-	-
Con SAM 10 mM	11	150	395	78	63	108

% de retención de la actividad específica	Wt	Nº 10	Nº 11	Nº 32	Nº 37	Nº 41
Control	100	100	100	100	100	100
Con Met 100 mM	7,6	97	94	79	83	74
Con Met 300 mM	-	70	56	-	-	-
Con SAM 10 mM	2,9	85	82	28	27	34

*En que U es la formación de 1 μ mol de CoA por minuto a temperatura ambiente

- 20 Se seleccionaron los mutantes *metA* nº 10 y *metA* nº 11 (SEQ ID NO: 5 y 7, respectivamente) para análisis adicional. Se analizó en los mutantes de *metA* nº 10 y nº 11 su falta de inhibición en un experimento que usa metionina 300 mM. Esta es cercana a la concentración máxima alcanzable en las condiciones de ensayo. La solubilidad de la metionina en agua es de 5,6 g/100 ml a 30 °C, que corresponde a una concentración de 375 mM. En presencia de metionina 300 mM, el mutante *metA* nº 10 retenía un 70 % de su actividad específica, y el mutante *metA* nº 11

retenía un 55 % de su actividad específica. Por tanto, los mutantes *metA* nº 10 y nº 11 pueden usarse en un microorganismo productor de metionina.

Producción de metionina con metA resistente a la inhibición por retroalimentación

5 Se clonaron individualmente *metA* nº 10 y *metA* nº11 en la cepa productora de metionina TF4076BJF. Se clonó también *MetA* nº 10 junto con *metYX* de *L. meyeri*. Se ensayaron los clones siguiendo el protocolo de fermentación descrito en el ejemplo 3A. Se valoraron las concentraciones de metionina después de 78 horas de fermentación y se muestran los resultados en la Tabla 11. No había acumulación de O-succinilhomoserina en ninguna de las fermentaciones. Se muestran en la FIG. 4 los cursos temporales de producción de metionina.

[Tabla 11]

10 **Acumulación de metionina**

Cepa	Valoración final de metionina (g/l)
TF4076BJF	2,1
TF4076BJF <i>metA</i> nº 10	6,3
TF4076BJF <i>metA</i> nº 11	4,5
TF4076BJF <i>metA</i> nº 10 + <i>metYX</i> (Lm)	6,6

15 Estos resultados muestran que la expresión de *metA* resistentes a la inhibición por retroalimentación aumentaba la producción de metionina y que la combinación de una ruta de sulfhidrilación directa y una ruta de *metABC* resistente a la inhibición por retroalimentación mostraba menos sinergia que la observada con la *MetA* nativa. La menor sinergia observada indica que la acumulación de metionina puede estar inhibiendo *MetY*. Para aumentar adicionalmente la producción de metionina, puede usarse una *MetY* resistente a la inhibición por retroalimentación.

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

Como se describe anteriormente, la formación de SAME disminuye la concentración de metionina y reduce la actividad de la ruta biosintética de metionina a través de la inhibición por retroalimentación de *metA*.

20 El aislamiento de mutantes del gen *metK* se facilita por la observación de que algunos mutantes resistentes a metionina tienen niveles reducidos de *metK* y sobreproducen metionina. La Tabla 12 enumera diversas mutaciones de *metK* que se ha descrito que causan una disminución de la actividad de *MetK*. Estos mutantes se construyeron como se describe a continuación.

25 Se clonó el gen *metK* de *E. coli* (número de acceso AP_003499 o BAE77005) y se sobreexpresó con un marcador de His N-terminal o C-terminal en el vector pET28b. Se efectuó una mutagénesis dirigida a sitio usando el clon *metK* marcado con His C-terminal para generar los mutantes deseados. Se confirmó la expresión de las proteínas *MetK* mutantes.

30 Se purificaron los mutantes de *MetK* (usando el marcador de His C-terminal) y se ensayaron *in vitro*. Se usó la proteína *MetK* marcada con His C-terminal de tipo silvestre como control. Se ensayaron los mutantes usando un ensayo radiactivo. Las condiciones de ensayo fueron como sigue:

Mezcla de ensayo:

1,0 ml de HEPES/KOH 0,5 M, pH 8,0

0,5 ml de KCl 1,0 M

0,2 ml de MgCl₂ 1,0 M

35 1,0 ml de ATP 100 mM (sal disódica, pH 8,0 con KOH)

0,1 ml de metionina 50 mM

0,1 ml de NEN [metil-¹⁴C]metionina

6,6 ml de H₂O

EDTA 25 mM, pH 8,0, detención de los ensayos.

5 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 detuvo la reacción con la adición de 150 µl de EDTA 25 mM. Se puntearon 100 µl de la reacción sobre un círculo de filtro de fosfocelulosa Whatman P-81 de 2,5 cm de diámetro (marcado a lápiz). Se lavaron los filtros con 3 l de agua destilada, se secaron al aire y se dispusieron en viales de centelleo con Aquasol. Se contaron las emisiones usando una ventana que se extiende de ^{14}C hasta aproximadamente 0. Se determinaron los niveles de eficacia de ensayo e inactivación añadiendo una cantidad conocida de cuentas de ^{14}C -SAM pura y procesando a lo largo de todo el procedimiento. Los fondos son típicamente < 100 cpm (cuentas totales aprox. 10^5 cpm por reacción).

[Tabla 12]

Actividad normalizada

Residuo	Posición	Reemplazo	Efecto esperado sobre la síntesis de SAM	Referencia	Actividad (CPM de SAME/µg de proteína purificada/min)**
His	14	Asn	Actividad reducida ~104 veces	J. Biol. Chem. 2000	7,7
Asp	16	Asn	Reducción de kcat ~103 veces	J. Biol. Chem. 1999	2,5
Gly	77	Val	Disminución esperada de la actividad de MetK	Comunicación personal de Markham	6,9
Cys	90	Ala	Solo un 10 % de la actividad WT	J. Biol. Chem. 1995	Igual que WT
Cys	90	Ser	Solo un 10 % de la actividad WT	J. Biol. Chem. 1995	23,2
Asp	118	Asn	Reducción de kcat ~103 veces	J. Biol. Chem. 1999	1,3
Val	185	Glu	Aumento de 6,4 veces de la Met excretada frente al control	AEM 2005	4,9
Asp	238	Asn	Reducción de kcat ~103 veces	J. Biol. Chem. 1999	1,9
Cys	239/240	Ala*	Solo un 10 % de la actividad WT	J. Biol. Chem. 1995	Igual que WT
Lys	245	Met	Actividad 42.000 veces menor que WT	J. Biol. Chem. 2000	2,5
Asp	271	Ala	Reducción de kcat ~103 veces	J. Biol. Chem. 1999	0,4 (no duplicado)
WT de control*		Ninguno		Cargill BioTDC	995,4
WT	No marcado	Ninguno		Markham Lab	5600

10 * La proteína MetK de control WT estaba también marcada con His C-terminal para comparación con las proteínas *metK* mutantes marcadas. Se observó una reducción de aproximadamente 6 veces de la actividad con la proteína MetK WT marcada en comparación con la actividad de la proteína MetK no marcada.

** actividad reseñada para un tiempo de reacción de 5 minutos

15 El producto de la reacción de MetK, SAME, es un inhibidor no competitivo de MetK. Por lo tanto, la cinética de la reacción es complicada de analizar y se espera que la diferencia entre las actividades del tipo silvestre y los mutantes sea aún mayor. Al comprender la actividad de las diversas enzimas MetK mutantes, puede diseñarse un hospedador de producción adecuado.

D. Regulación del transportador de SAME

La S-adenosilMet (SAME) sirve como donante de grupo metilo primario en todos los organismos, está implicado en la biosíntesis de poliamina y es esencial para el crecimiento celular. La 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. Es una alternativa a la regulación negativa de *metK* como se describe anteriormente

5 proporcionar a *E. coli* la capacidad de captar SAME y simultáneamente desactivar el gen *metK*, reduciendo o evitando la utilización de metionina a través de esa ruta. El crecimiento celular puede controlarse entonces mediante la adición de SAME al medio de fermentación.

Se ha identificado un sistema de transporte de SAME de alta afinidad en *Rickettsia* (Tucker *et al.*, *J. Bact.* 185: 3031-3035, 2003). Este transportador de SAME tiene valores de K_T de 2-8 μM , que son comparables con los valores para el transportador de *S. cerevisiae* (3,3 μM), *P. carinii* (4,5 μM) e hígado de rata (8,9 μM). Además, se ha reseñado que el sistema de transporte de SAME en *Rickettsia* puede complementar un mutante de delección de *metK* en *E. coli* (Driskell *et al.*, *J. Bact.* 187: 5719-5722, 2005).

10

Se transformaron las cepas W3110 y TF4076BJF con un plásmido que contiene el transportador de SAM mencionado anteriormente. Se desactivó el gen *metK* de W3110 y se verificó por PCR. Según estas modificaciones, la nueva cepa debería ser capaz de crecer solo en presencia de SAM, pero no sin ella. Sin embargo, seguía creciendo tanto en ausencia como en presencia de SAM exógena.

15

E. Desactivación de los transportadores de captación de metionina para aumentar la metionina en el medio de fermentación

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

20

25

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

30

metJ, la proteína represora de metionina global, se ha mostrado que controla negativamente la expresión del operón que codifica el locus *metD*. La transcripción de los genes *metD* aumenta tras la privación de metionina, que es un correpresor de *metJ*. En células con delección de *metJ*, los transportadores se expresan más y no se reprimen por metionina (Merlin *et al.*, *J. Bacteriol.* 184: 5513-5517, 2002). Las cepas de producción de metionina tienen generalmente secuencias de *metJ* atenuadas o delecciones de *metJ* de modo que, para aumentar la producción, puede ser particularmente importante reducir la actividad de importación de metionina. Las cepas pueden modificarse por desactivación del sistema de captación de metionina *metD*. Esto impedirá la captación de metionina y evitará el ciclo de gasto de energía inútil de captación/excreción.

35

La desactivación de *metD* daba como resultado un 25 % de aumento de la acumulación de metionina en el caldo de fermentación, medido por el protocolo de matraz agitado descrito en el ejemplo 3 anterior.

40

F. Sobreexpresión de *methH*

El aumento del flujo de carbono hacia la ruta de metionina debido a modificaciones en las cepas descritas aquí puede conducir a una acumulación de homocisteína dentro de la célula. La homocisteína es muy tóxica para la célula. Para evitar cualquier acumulación y convertir la homocisteína en metionina, es muy importante tener una actividad homocisteína metilasa muy activa (EC 2.1.1.13 y 2.1.1.14), que se codifica por *metE* y *methH*, respectivamente. Es un modo de llevar a cabo esto sobreexpresar estos genes en un sistema de plásmido o disponiendo la copia cromosómica bajo el control de un promotor fuerte.

45

Se sobreexpresó el gen *methH* nativo de *E. coli* bajo varios promotores diferentes en una cepa que contenía las rutas duales *metABC* y *metXY*, y se midió la producción de metionina en el protocolo de matraz agitado estándar. Los tres vectores usados para la sobreexpresión de *methH* fueron pCL-P(*cysK*), pCL-P(*pro*) y pCL-P(CJ-1), que se modificaron respectivamente a partir del plásmido comercialmente disponible pCL1920 reemplazando el promotor Plac por el promotor del gen *cysK* de *E. coli*, el promotor del vector comercial pPROLar y el promotor CJ1 propiedad de CJ Corporation. Se localizó el ORF del gen *methH* de *E. coli* justo en dirección 3' de los promotores. Se muestran en la Tabla 13 siguiente los resultados obtenidos. Resultaba evidente que, incluso a los niveles relativamente bajos de metionina acumulados en el protocolo de matraz agitado, la presencia de una alta concentración de homocisteína metilasa tenía un efecto positivo muy significativo sobre la producción de metionina. El efecto era aún más pronunciado en fermentadores.

50

55

[Tabla 13]

Efecto de la sobreexpresión de *metH* sobre la producción de metionina

Cepas	DO	Glucosa usada	Metionina producida
		g/l	mg/l
TF4076BJF <i>met</i> YXLm	7,4	40,0	868
TF4076BJF <i>met</i> YXLm pCL-P (<i>cysK</i>) <i>met H</i>	11,7	33,9	1289
TF4076BJF <i>met</i> YXLm pCL-P (pro) <i>met H</i>	7,5	32,8	1062
TF4076BJF <i>met</i> YXLm pCL-P (CJ-1) <i>met H</i>	12,4	40,0	1337
TF4076BJF <i>met</i> YXDr	10	38,2	569
TF4076BJF <i>met</i> YXDr pCL-P (<i>cysK</i>) <i>met H</i>	15,4	40,0	896
TF4076BJF <i>met</i> YXDr pCL-P (pro) <i>met H</i>	12,5	40,0	786
TF4076BJF <i>met</i> YXDr pCL-P (CJ-1) <i>met H</i>	15	40,0	856

5 **G. Mejora de la captación de sulfato y aumento de la reserva de APS en organismos productores de metionina**

Este ejemplo describe un procedimiento de genomanipulación de *E. coli* para sortear el intermedio PAPS en su ruta de asimilación de azufre endógena. La nueva ruta creada requiere una molécula menos de ATP por cada molécula de sulfato reducida a sulfuro, por tanto, tiene más eficacia energética (véase la FIG. 6).

10 Como se describe anteriormente, la FIG. 6 muestra dos modos para aprovechar las rutas de asimilación de azufre alternativas. Un modo es clonar la adenililsulfato reductasa, gen *cysH* (EC 1.8.4.9) de *Bacillus* o *P. aeruginosa* e incorporarla al genoma de *E. coli* o expresarla a partir de un plásmido. Esto permite que APS se convierta en sulfito en una sola etapa, evitando por tanto la conversión de APS en PAPS catalizada por la APS cinasa de *E. coli* (*cysC*). El segundo modo sería mutar el gen de PAPS reductasa de *E. coli*, basándose en los homólogos de *cysH* bacteriana, de modo que se cambie su especificidad de sustrato de PAPS a APS.

15 Se clonaron 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) en plásmidos y se ensayaron para determinar si podían complementar los mutantes de desactivación de *cysC* o *cysH* de *E. coli*, que son auxotróficos tanto para cisteína como para metionina.

20 Brevemente, se transformaron los genes *cysH* de *Bacillus subtilis* 168 y *Pseudomonas aeruginosa* PA01 en BL21(DE3) Δ *cysH*, una desactivación de *cysH* de BL21(DE3), para ensayar la complementación. Se usaron colonias individuales de las siguientes cuatro cepas para inocular cultivos de 5 ml que contienen el medio Overnight Express (OnEX: medio definido suplementado con aminoácidos pero no con cisteína ni metionina) de Novagen.

25 Se incubaron los cultivos durante 48 horas a 30 °C con agitación constante. Los resultados presentados en la Tabla 14 indican que tanto el gen *cysH* de *B. subtilis* como de *P. aeruginosa* eran capaces de complementar la desactivación de *cysH* en *E. coli* y mantener el crecimiento.

[Tabla 14]

Densidad óptica a 600 nm de experimentos de complementación de Δ *cysH*

Cepa	DO ₆₀₀
BL21(DE3) (cepa de tipo silvestre)	5,2
BL21(DE3) Δ <i>cysH</i> (con delección de <i>cysH</i>)	0
BL21(DE3) Δ <i>cysH</i> + pET23B <i>cysH</i> (adición de <i>cysH</i> de <i>Bacillus</i>)	7,2
BL21(DE3) Δ <i>cysH</i> + pET23P <i>cysH</i> (adición de <i>cysH</i> de <i>Pseudomonas</i>)	6,8

De forma similar, se usó una cepa que tenía el gen *cysC* desactivado para ensayar la complementación por los genes *cysH* de *B. subtilis* y *P. aeruginosa*. Se transformó la cepa BL21(DE3) Δ *cysC* con los plásmidos pET23a, pET23a+*cysH* (*B. subtilis*) y pET23a+*cysH* (*P. aeruginosa*), respectivamente. Se inocularon colonias individuales 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_{600 nm}. Los resultados, mostrados en la Tabla 15, indicaban que la APS reductasa codificada por *cysH* tanto de *B. subtilis* como de *P. aeruginosa* podía complementar la mutación de *cysC* en BL21(DE3), lo que demostraba que era posible sortear la formación de PAPS.

[Tabla 15]

10 Densidad óptica a 600 nm de experimentos de complementación de Δ *cysC*

Cepa	DO _{600 nm} ^a
BL21(DE3)	4,5
BL21(DE3) Δ <i>cysC</i> +pET23a	0,0
BL21(DE3) Δ <i>cysC</i> +pET23a + <i>cysH</i> (<i>B. subtilis</i>)	2,5
BL21(DE3) Δ <i>cysC</i> +pET23a + <i>cysH</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	4,2

^a. Los resultados son la media de tres cultivos

Sobreexpresión de enzimas en la ruta de asimilación de azufre

Como se describe anteriormente, para aumentar la producción de metionina puede ser de ayuda tener una ruta de asimilación de azufre muy eficaz. Para facilitar la sulfhidrilación directa del precursor de acilhomoserina, es esencial la disponibilidad de SH₂. Se clonaron todos los genes principales de la ruta de asimilación de azufre y se sobreexpresaron en la cepa de producción de metionina TF4076BJF. Los genes sobreexpresados eran:

cys PUWA: sulfato permeasa

cysDN: ATP sulfurilasa (EC 2.7.7.4)

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

20 *CysJcysG*: NADPH-Sulfito reductasa (EC 1.8.1.2)

CysB: activador de la transcripción

Se sobreexpresaron estos genes en una cepa que contenía las rutas duales *metABC* y *metXY*, y se midió la producción de metionina en el protocolo de matraz agitado estándar. Se clonaron respectivamente los cinco grupos anteriormente mencionados de genes de asimilación de azufre en el vector pCL-(Prmf), que se construyó reemplazando el promotor Plac del plásmido pCL1920 por el promotor del gen *rmf* de *E. coli*. Se muestran en la Tabla 16 siguiente los resultados obtenidos:

[Tabla 16]

Resultados de la sobreexpresión de diversas enzimas de la ruta de asimilación de azufre

Cepas	DO	Met	Met/DO
		mg/ml	
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

La sobreexpresión de las enzimas de transporte así como del regulador de la transcripción dio como resultado una menor producción de metionina y una caída significativa en la cantidad de metionina por unidad de masa celular. Aumentar la actividad de sulfurilasa, APC cinasa y sulfotransferasa dio como resultado en total una producción aumentada de metionina por unidad de célula así como de metionina total producida. Dado que estos aumentos se observan en una cepa que alberga dos plásmidos diferentes, puede esperarse que los resultados mejoren mucho más una vez se ajuste y optimice la expresión de las enzimas.

Ejemplo 4: Cepas de producción de metionina ejemplares

Como se describe anteriormente, las diversas modificaciones genéticas descritas en la presente memoria pueden hacerse mediante la incorporación de secuencias de ADN recombinante independientes del cromosoma, o pueden incorporarse las secuencias de ADN recombinante al cromosoma de la cepa de producción. Las secuencias de ADN recombinante pueden incorporarse a las células hospedadoras en una sola copia o en múltiples copias.

i) Se genomanipula un microorganismo, tal como ATCC n° 13070 de *E. coli* o TF4076, para contener una delección funcional de *thrB* y *metJ* de modo que los genes se atenúen. Este microorganismo expresa los genes *metX* y *metY*, así como una secuencia de ácido nucleico recombinante que causa la sobreexpresión del gen *metH* nativo. La expresión de *metX* y *metY* introduce una ruta adicional en *E. coli* y la sobreexpresión del gen *metH* nativo causa un flujo aumentado de homocisteína hacia metionina.

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

iii) Se crea aún otra cepa de producción realizando las siguientes modificaciones en el microorganismo descrito en i). Se modifica adicionalmente el microorganismo descrito en i) reemplazando el gen *metA* nativo por un gen *metA* resistente a la inhibición por retroalimentación, tal como los descritos en el ejemplo 3.

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

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

vi) Se crean cepas de producción adicionales realizando las siguientes modificaciones en cualquiera de las cepas de producción descritas en la presente memoria. Se genomanipulan las cepas de producción para sobreexpresar los genes *cysDN*, *cysIJ* o *cysCH* o combinaciones de los mismos para mejorar la asimilación de azufre. Opcionalmente, se modifican adicionalmente estas cepas de producción para reemplazar los *cysC* y *cysH* nativos de *E. coli* por un solo gen *cysH* de *P. aeruginosa* o *B. subtilis*.

vii) Se prepara otra cepa de producción modificando cualquiera de las cepas de producción descritas en la presente memoria de tal modo que se atenúe el gen importador de metionina *metD*.

35

ES 2 534 375 T3

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 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

ES 2 534 375 T3

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

<212> ADN

5 <213> *Escherichia coli*

<400> 3

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

<210> 4

<211> 309

10 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<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

ES 2 534 375 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 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

ES 2 534 375 T3

<210> 5
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

5 <400> 5

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa gtttctgac      120
cttaacctga tgcogaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacogatt cccgtgaatc gcgcaacacg      240
cccgcagagc atotgaacaa 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 tttccgcat gtggaagccg gactagaccg 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
 10 <213> *Escherichia coli*

<400> 6

```

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
    
```

ES 2 534 375 T3

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

ES 2 534 375 T3

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 7

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc    60
tttgtgatga caacttctcg tgcgcctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgac    120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac    180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcctcgatt cccgtgaatc gcgcaacacg    240
cccgagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt    300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgcccgtg ggcctgggtg ggtttaatga tgtcgttac    360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtct    420
gtctgctggg cggtagagcc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc    480
accgaaaaac tctctggcgt ttaagagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg    540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg    600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat    660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcy    720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg    780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac    840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatagcat    900
ctacggcaca tgaacccaac gctggattaa    930
    
```

5 <210> 8

<211> 309

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 8

```

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
    
```

10

ES 2 534 375 T3

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

<212> ADN

5 <213> *Escherichia coli*

ES 2 534 375 T3

<400> 9

```

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

```

<210> 10

<211> 309

5 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<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

```

ES 2 534 375 T3

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

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

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

	<400> 11		
	gctagccatg gttaaagttt atgccccg		28
	<210> 12		
	<211> 29		
5	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 12		
10	gagctcttag ttttccagta ctcgtgcgc		29
	<210> 13		
	<211> 71		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 13		
	atggctgaat ggagcggcga atatatcagc ccatacgtg agcacggcaa ggtgtaggct		60
	ggagctgott c		71
	<210> 14		
20	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
25	<400> 14		
	gtattccac gtctccgggt taatcccat ctcacgatg atctccatat gaatattctc		60
	cttag		65
	<210> 15		
	<211> 19		
	<212> ADN		
30	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 15		

	gggctttgtc ggtgaaatg	19
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 16	
	actttgcat gagcgagag	19
10	<210> 17	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador de PCR	
	<400> 17	
	gctagccatg agcttttttc acgccag	27
	<210> 18	
	<211> 26	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 18	
25	gagctttat aaaccaggtc gaacct	26
	<210> 19	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 19	
	gagctgatga gcttttttca cgccag	26
	<210> 20	
35	<211> 26	

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
5	<400> 20	
	aagcttttat aaaccaggtc gaaccc	26
	<210> 21	
	<211> 32	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 21	
	cggggtacca ccgcgggctt attccattac at	32
15	<210> 22	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de PCR	
	<400> 22	
	acgcgatatc ttaatctcct agattgggtt tc	32
	<210> 23	
	<211> 28	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 23	
30	cggggtacct ggttacaaca acgcctgg	28
	<210> 24	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de PCR	

	<400> 24		
	catgatatct acctcgttac ctttggtcg		29
	<210> 25		
	<211> 70		
5	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 25		
	ttactctggt gcctgacatt tcaccgacaa agcccaggga acttcatcac gtgtaggctg		60
10	gagctgcttc		70
	<210> 26		
	<211> 69		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 26		
	ttacccttg tttgcagccc ggaagccatt ttccaggctg gcaattaaat catatgaata		60
	tcctcctta		69
	<210> 27		
20	<211> 71		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
25	<400> 27		
	caatttcttg cgtgaagaaa acgtctttgt gatgacaact tctcgtgcgt gtgtaggctg		60
	gagctgcttc c		71
	<210> 28		
	<211> 70		
	<212> ADN		
30	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		

	<400> 28		
	aatccagcgt tggattcatg tgccgtagat cgtatggcgt gatctggtag catatgaata	60	
	tcctccttag	70	
	<210> 29		
	<211> 28		
5	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 29		
10	aatggatcct gccgtgagcg gcgaatac	28	
	<210> 30		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 30		
	agctctagac tgctgaggta cgtttcgg	28	
	<210> 31		
20	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
25	<400> 31		
	cgaagtaatc gcaacatccg	20	
	<210> 32		
	<211> 20		
	<212> ADN		
30	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 32		
	gtctgctatg tggtgctatc	20	

<210> 33
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial
5 <220>
<223> Cebador de PCR
<400> 33
gccaggatcc gatgacgcgt aaacaggcca c **31**

<210> 34
10 <211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador de PCR
15 <400> 34
cgcgaagctt ttaccocctt gtttgcagcc **30**

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado con actividad de homoserina O-succiniltransferasa, que muestra una sensibilidad reducida ante la inhibición por retroalimentación por L-metionina en comparación con un polipéptido de homoserina O-succiniltransferasa de tipo silvestre derivado de *E. coli*, y que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2.
2. Un nucleótido aislado que codifica el péptido aislado según la reivindicación 1.
3. El nucleótido aislado de la reivindicación 2, que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1.
4. Un plásmido que comprende el nucleótido aislado según la reivindicación 2.
5. Una cepa de microorganismo transformada con el plásmido según la reivindicación 4.
- 10 6. Un procedimiento de producción de L-metionina que comprende: cultivar el microorganismo según la reivindicación 5 en condiciones que permitan la producción de L-metionina y aislar la L-metionina así producida.

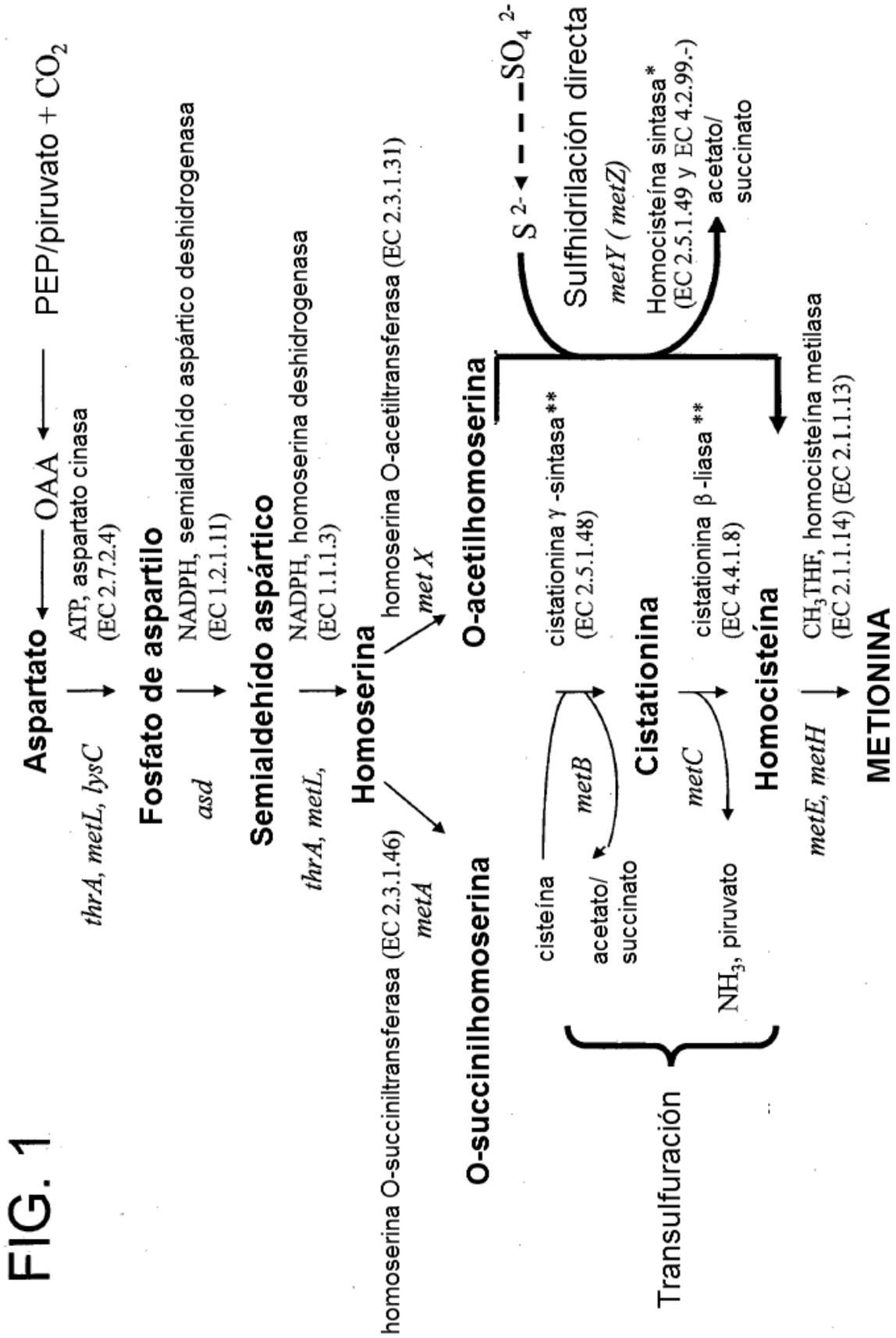
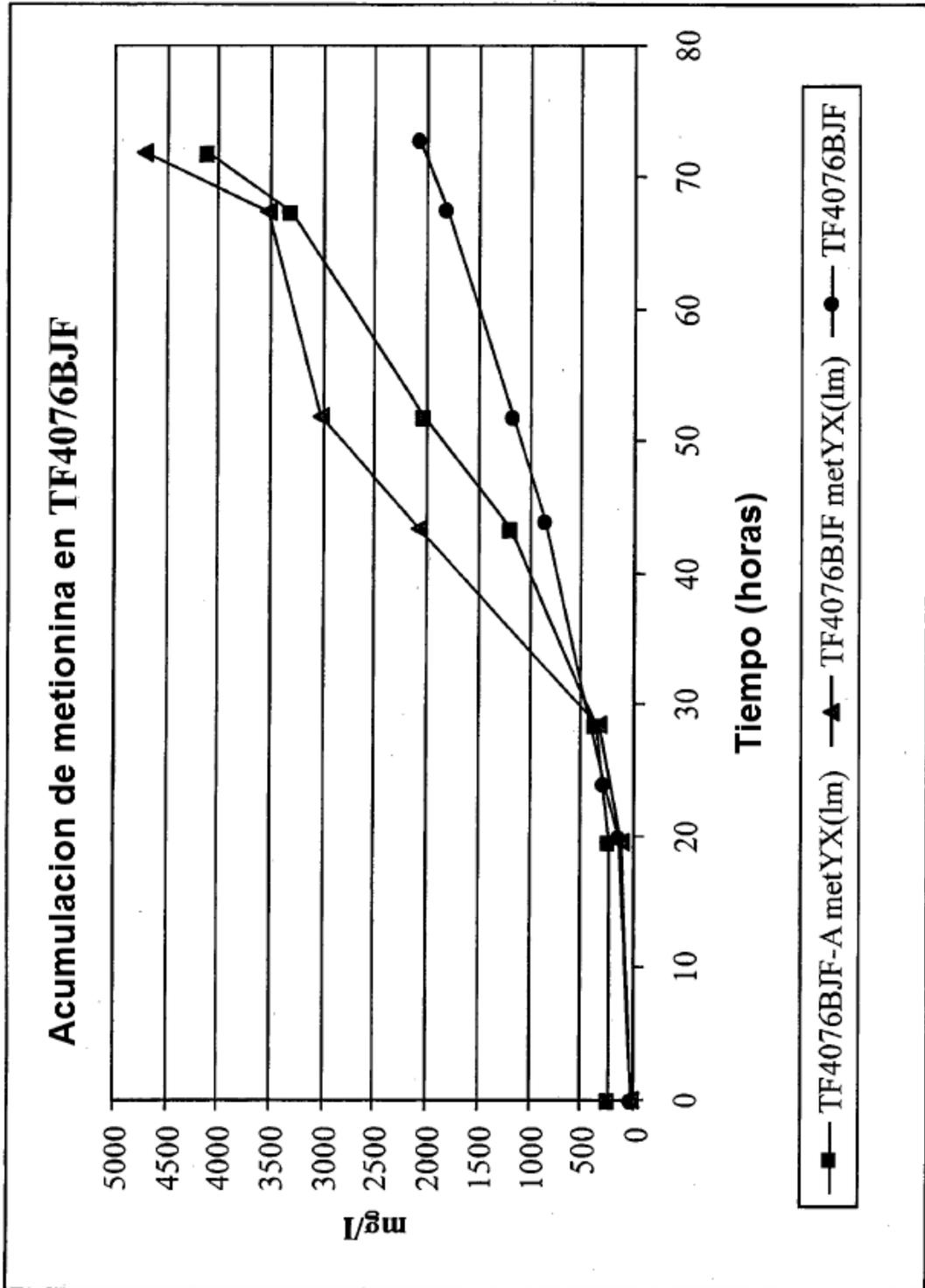


FIG. 2



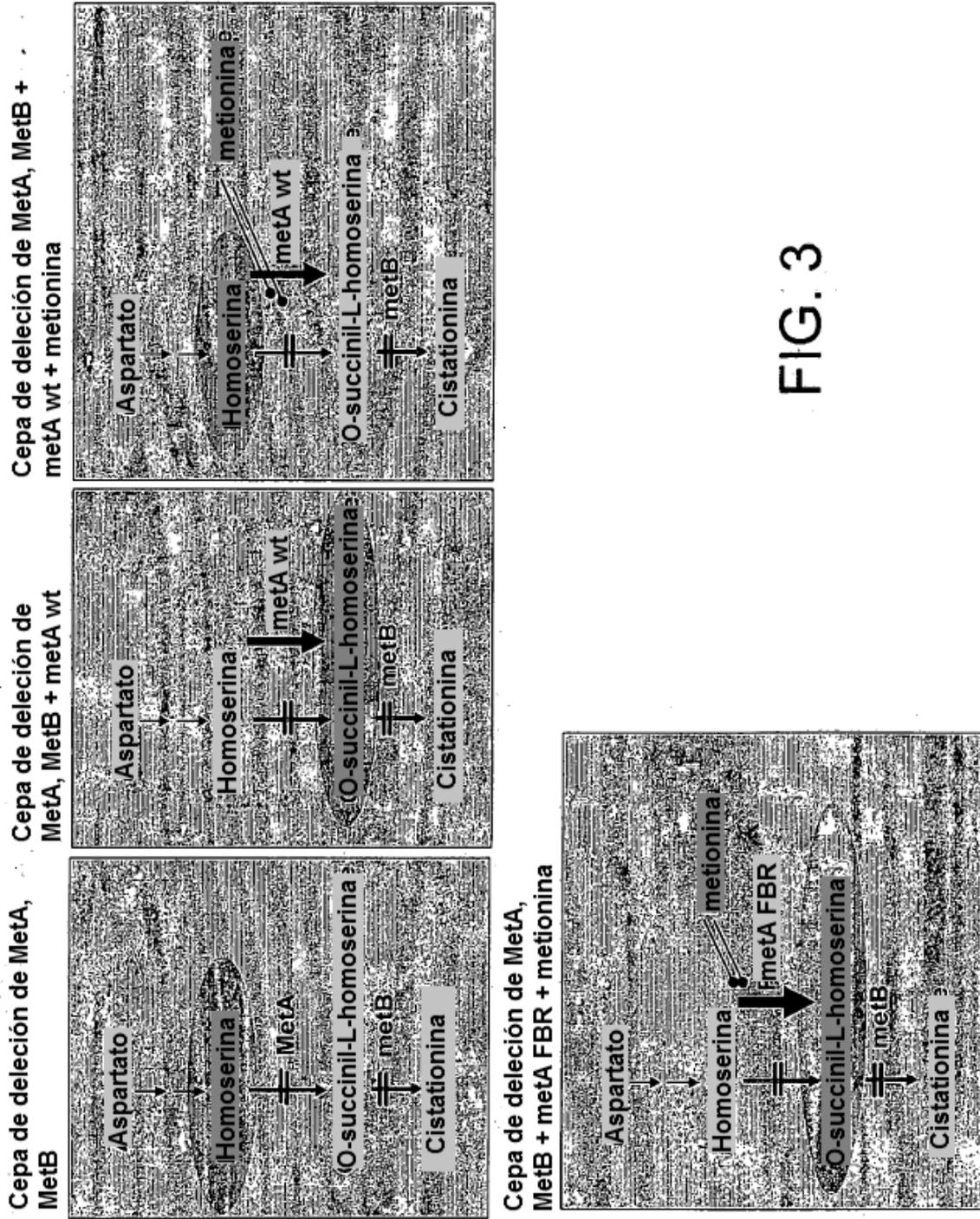


FIG. 3

metA FBR: metA resistente a retroalimentación

FIG.4

Acumulación de metionina en TF4076BJF

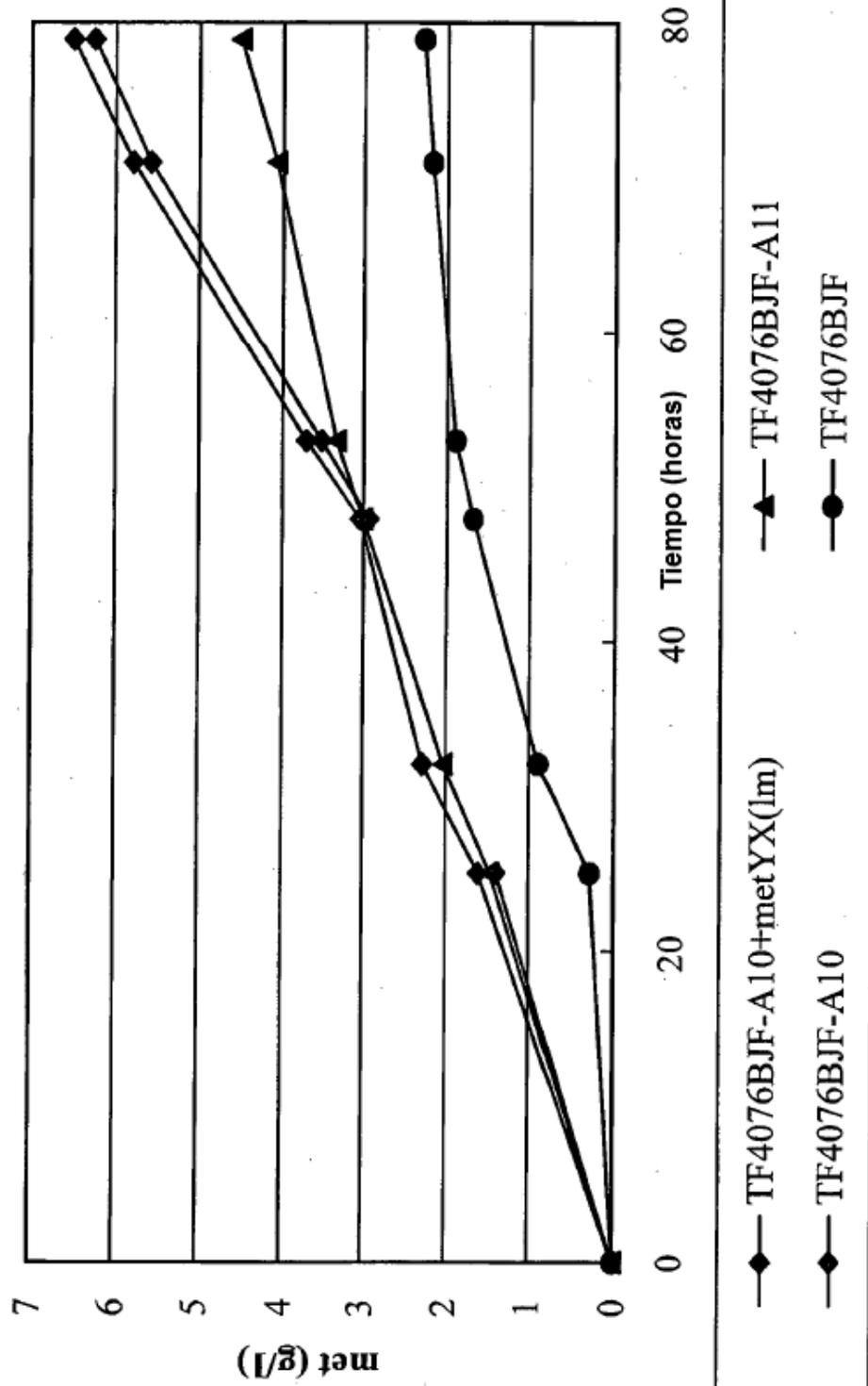
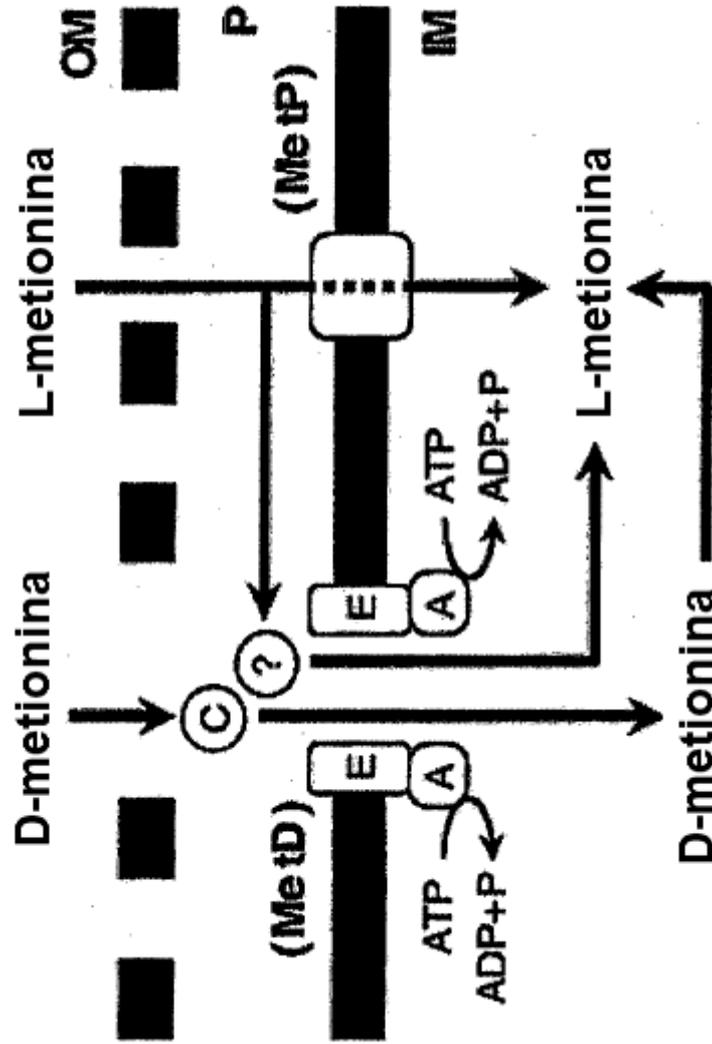


FIG. 5



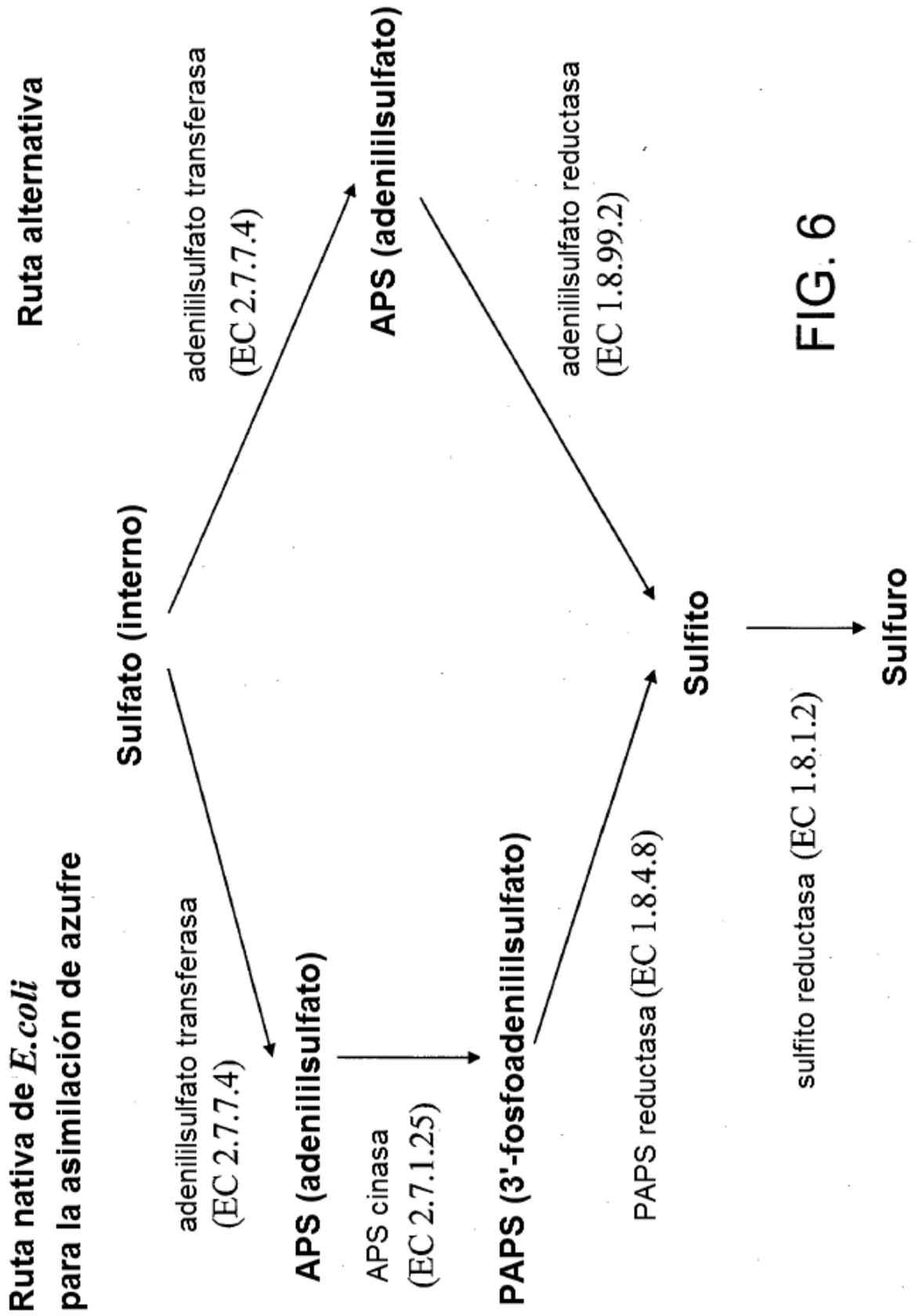


FIG. 6