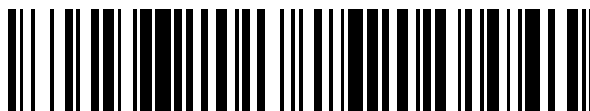


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 082**

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 14173993 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2808381**

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2016

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 2 575 082 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 métodos de producción de metionina

Campo

- 5 Se dan a conocer composiciones, tales como microorganismos, enzimas y productos químicos, así como métodos para usar los mismos para producir metionina y productos relacionados.

Antecedentes

- 10 La metionina es un aminoácido esencial en la dieta para animales. Se ha producido metionina de manera sintética durante un largo periodo de tiempo mediante síntesis química de múltiples etapas empleando acroleína, metilmercaptano y cianuro como materiales de partida. Hay dos formas de producto: D,L-metionina y su análogo de hidroxilo. La D-metionina se convierte en el isómero L requerido *in vivo*, a diferencia de todos los otros aminoácidos. Se ha notificado que el mercado de la metionina de calidad para piensos está mejorando debido a un aumento de la demanda en aves de corral y más recientemente en la complementación de piensos para cerdos. La capacidad de los principales productores de metionina (Degussa AG, Adisseo y Novus) para cumplir la demanda del mercado depende de los suministros de materias prima. Los productos intermedios acroleína y metilmercaptano deben convertirse en 3-metiltiopropionaldehído (MMP) y además en metionina usando cianuro de hidrógeno. Los tres productores tienen planes de expansión de sus instalaciones de producción de metionina y de integración con la producción de materias primas también (Chem. Marketing Reporter 7 de abril de 2003).

- 20 Las rutas de biosíntesis para la metionina (un miembro de la familia de aminoácidos de aspartato) se han estudiado en varios organismos y muestran similitudes así como diferencias. La primera etapa especializada, 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 o bien acetilhomoserina o bien succinilhomoserina. La acilhomoserina se convierte entonces en homocisteína por medio de una trans-sulfuración o una ruta de sulfhidrilación directa. Se ha notificado que ambas rutas están presentes y son funcionales en levaduras, hongos, plantas verdes y la bacteria *Corynebacterium glutamicum*. *E. coli* presenta sólo la ruta de trans-sulfuración. 25 La ruta de trans-sulfuración discurre a través de cistationina como producto intermedio y utiliza cisteína como donador de azufre. La ruta de sulfhidrilación directa implica la incorporación directa de sulfuro a la acilhomoserina. La última etapa en la ruta implica la conversión de homocisteína en metionina catalizada por una homocisteína metiltransferasa, codificada por los genes *metE* o *metH*.

- 30 Otros aminoácidos importantes, tales como lisina, treonina y triptófano, se producen por medio de fermentación para su uso en pienso para animales. Por tanto, estos aminoácidos pueden prepararse usando glucosa y otros recursos renovables como materiales de partida. Desafortunadamente, la producción de metionina por medio de fermentación no ha sido satisfactoria y se usa todavía hoy en día la síntesis química de metionina. Esto se debe en parte a la falta de una ruta de biosíntesis modificada por ingeniería genética eficaz para la producción de metionina, y de un huésped de producción adecuado.

- 35 La siguiente divulgación proporciona una ruta de biosíntesis de metionina mejorada, así como un huésped de producción.

Sumario

- 40 Se describen en el presente documento la producción de metionina y productos relacionados, tales como S-adenosilmetionina (SAME), mediante fermentación. También se describen microorganismos que se han modificado por ingeniería genética para incluir moléculas de ADN recombinante y producir metionina.

- 45 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 trans-sulfuración (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 una concentración extracelular de metionina o SAME de al menos 0,1, 1, 2, 5, 10, 50, 75, 90, o de al menos 100 g/l.

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

- 50 En otros ejemplos, más de dos rutas de biosíntesis de metionina pueden ser activas 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 modificados por ingeniería genética para preparar metionina y productos relacionados, tales como SAME, producen al menos el 10% de la metionina a partir de la actividad de la ruta de

biosíntesis de trans-sulfuración. En otros ejemplos producen al menos el 20, el 30, el 40, o al menos el 50% del producto a partir de la actividad de la ruta de biosíntesis de trans-sulfuración.

En algunos ejemplos, los microorganismos modificados por ingeniería genética para preparar metionina y productos relacionados, tales como SAME, producen al menos el 10% de la metionina a partir de la actividad de la ruta de biosíntesis de sulfhidrilación directa. En otros ejemplos producen al menos el 20, el 30, el 40, o al menos el 50% del producto a partir de la actividad de la ruta de biosíntesis de sulfhidrilación directa.

En algunos ejemplos, el microorganismo modificado por ingeniería genética para preparar metionina y productos relacionados se ha modificado adicionalmente por ingeniería genética 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 modifica adicionalmente por ingeniería genética 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*.

También se proporcionan métodos de preparación de metionina y SAME. Estos métodos incluyen cultivar el microorganismo modificado por ingeniería genética para preparar metionina y productos relacionados y aislar los productos. En algunos ejemplos el microorganismo puede ser *E. coli*, *Pseudomonas* sp. o *Corynebacterium glutamicum*.

También se describen en el presente documento secuencias de ácido nucleico novedosas y sus secuencias de aminoácidos correspondientes (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, también son útiles para producir agentes de unión específica tales como anticuerpos.

También se da a conocer un método de mejora de la asimilación de azufre sorteando el producto intermedio fosfoadenilil sulfato (PAPS). Este método puede usarse con cualquier microorganismo usado para producir metionina. El método se logra introduciendo en un microorganismo una secuencia de ácido nucleico recombinante que permite la sobreexpresión de una o más adenilil sulfato reductasas (EC 1.8.9.92 ó 1.8.4.9). La sobreexpresión puede ser a partir de la introducción de secuencias de ácido nucleico recombinante que alteran o introducen nuevos elementos de control, tales como promotores o potenciadores, que provocan un aumento en la producción de adenilil sulfato reductasa endógena o la secuencia de ácido nucleico recombinante puede codificar para adenilil sulfato reductasa.

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

Breve descripción de los dibujos

La figura 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 mediante MetA o MetX. Algunos microorganismos, tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. utilizan polipéptidos de MetA para preparar O-succinilhomoserina mientras que otros microorganismos tales como *Corynebacterium* y *Leptospira* sp. usan MetX para preparar O-acetilhomoserina. Entonces O-succinilhomoserina y O-acetilhomoserina o bien pueden convertirse directamente en homocisteína a través de sulfhidrilación, o bien pueden convertirse en homocisteína a través de trans-sulfuración (ambas reacciones se describen en más detalle en el presente documento). Se identifican enzimas asociadas con trans-sulfuración con dos asteriscos (**), y se identifican enzimas asociadas con sulfhidrilación con un único asterisco (*).

La figura 2 es un gráfico que muestra la acumulación de metionina en TF4076BJF, con sólo actividad de trans-sulfuración (TF4076BJF), sólo actividad de sulfhidrilación (TF4076BJF-A), o ambas simultáneamente (TF4076BJF metYX(Lm)).

La figura 3 muestra una representación esquemática de la metodología de examen usada para identificar mutantes de *metA* que son resistentes a la inhibición por retroalimentación. (El producto acumulado en cada caso se muestra en el óvalo sombreado).

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

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

La figura 6 muestra la ruta de asimilación de azufre nativa una ruta alternativa novedosa.

Lista de secuencias

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos enumeradas en la lista de secuencias adjunta se muestran usando abreviaturas de letras convencionales para bases de nucleótidos, y el código de tres letras para los aminoácidos. Sólo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida por cualquier referencia a la hebra presentada.

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

Las SEQ ID NO: 11-34 muestran diversas secuencias de cebadores usados en los ejemplos.

Descripción detallada

Abreviaturas y términos

- 10 Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y guiar a los expertos habituales en la técnica en la práctica de la presente divulgación. Tal como se usa en el presente documento, “que comprende” significa “que incluye” y las formas singulares “un” o “una” o “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a “que comprende una célula” incluye una o una pluralidad de tales células, y la referencia a “que 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 expertos habituales en la técnica, y así sucesivamente. El término “o” se refiere a un único elemento de elementos alternativos establecidos o a una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la frase “actividad homocisteína sintasa o actividad cistationina γ -sintasa” se refiere a actividad homocisteína sintasa, actividad cistationina γ -sintasa, o una combinación de tanto
- 15 actividad homocisteína sintasa como actividad cistationina γ -sintasa.
- 20

- A menos que se explique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente divulgación, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos. Otras características y ventajas de la divulgación resultan evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.
- 25

- Números de registro: Los números de registro a lo largo de toda esta descripción se derivan de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mantenida por el National Institute of Health, EE.UU. Los números de registro son tal como se proporcionan en la base de datos el 20 de febrero de 2007.
- 30

Números de clasificación de enzimas (EC.): Los números de EC proporcionados a lo largo de toda esta descripción se 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 de EC son tal como se proporcionan en la base de datos el 20 de febrero de 2007.

- 35 Atenuar: Disminuir el impacto, la actividad o fuerza de algo. En un ejemplo, se disminuye la sensibilidad de una enzima particular a la inhibición por retroalimentación o inhibición provocada por una composición que no es un producto o un reactante (retroalimentación no específica de la ruta) de manera que la actividad enzimática no se ve afectada por la presencia de un compuesto. Por ejemplo, el gen *metA* y su secuencia de aminoácidos correspondiente (tal como las secuencias a modo de ejemplo proporcionadas en SEQ ID NO: 2) muestran varias mutaciones que atenúan su sensibilidad a la inhibición por retroalimentación. La atenuación de la sensibilidad de MetA se describe en más detalle en el ejemplo 3.B. En otro ejemplo, puede hacerse referencia a una enzima que es menos activa como atenuada.
- 40

- ADNc (ADN complementario): Un trozo de ADN que carece de segmentos internos, no codificantes (intrones) y secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc puede sintetizarse mediante transcripción inversa a partir de ARN mensajero extraído de células.
- 45

Deleción: La eliminación de uno o más nucleótidos de una molécula de ácido nucleico o uno o más aminoácidos de una proteína, estando las regiones en cualquier lado unidas.

- Detectable: Que puede tener una existencia o presencia establecida. 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 a partir del producto o el reactante es lo suficientemente fuerte como para medirse.
- 50

Actividad de sulfhidrilación directa: La capacidad para hacer reaccionar OSHS u OAHS directamente con S^{2-} para producir homocisteína. Los péptidos que tienen esta actividad incluyen por ejemplo, homocisteína sintasas (EC 4.2.99.-, EC 2.5.1.49) que se codifican 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 los organismos vivos (algunos virus tienen genes que incluyen ácido ribonucleico, ARN). Las unidades de repetición en polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales incluye una de las cuatro bases, adenina, guanina, citosina y timina unida a un azúcar de desoxirribosa a la que está unida un grupo fosfato. Tripletes de nucleótidos, denominados codones, en moléculas de ADN codifican un aminoácido en un péptido. El término codón también se usa para las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARNm en el que se transcribe la secuencia de ADN.

Endógeno: Tal como se usa en el presente documento con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula o microorganismo particular, se refiere a una secuencia de ácido nucleico o péptido que está en la célula y no se puso en la célula usando técnicas de ingeniería genética recombinantes. Por ejemplo, un gen que estaba en la célula cuando la célula se aisló originalmente de la naturaleza. Un gen se considera todavía endógeno si las secuencias de control, tales como secuencias promotoras o potenciadoras que activan la transcripción o traducción se han alterado a través de técnicas recombinantes.

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

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

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

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína o célula) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en los que se produce el componente de manera natural, tales como 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 mediante métodos de purificación convencionales. El término también engloba moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas mediante expresión recombinante en una célula huésped así como moléculas de ácido nucleico y proteínas sintetizadas químicamente.

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

Molécula de ácido nucleico: Engloba tanto moléculas de ARN como de ADN incluyendo, sin limitación, ADNc, ADN genómico y ARNm. Incluye moléculas de ácido nucleico sintéticas, tales como las que se sintetizan químicamente o se producen de manera recombinante. La molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria. Cuando es monocatenaria, la molécula de ácido nucleico puede ser la hebra sentido o la hebra antisentido. Además, la molécula de ácido nucleico puede ser circular o lineal.

Operativamente unido: Una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN operativamente unidas son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones que codifican proteína, en el mismo marco de lectura. Las configuraciones de genes separados que se transcriben en tándem como un único ARN mensajero se denominan operones. Por tanto la colocación de genes en proximidad estrecha, por ejemplo en un vector de plásmido, bajo la regulación transcripcional de un único promotor, constituye un operón sintético.

ORF (marco de lectura abierto): Una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican péptidos, polipéptidos o aminoácidos sin ningún codón de terminación. Estas secuencias habitualmente pueden traducirse en un péptido.

Purificado: El término purificado no requiere pureza absoluta; en su lugar, está previsto como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de péptido purificado, tal como una preparación de succinilCoA homoserina aciltransferasa, o una preparación de homocisteína sintasa, es una en la que el péptido está más concentrado de lo que está el péptido en su entorno dentro de una célula. Por ejemplo, un péptido purificado es uno que se separa

sustancialmente de componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono y otros péptidos) que pueden acompañarlo. En otro ejemplo, una preparación de péptido purificado es una en la que el péptido está sustancialmente libre de contaminantes, tales como los que podrían estar presentes tras la síntesis química del péptido.

- 5 En un ejemplo, un péptido está purificado cuando al menos aproximadamente el 50% en peso de una muestra se compone del péptido, por ejemplo cuando al menos aproximadamente el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 92%, el 95%, el 98% o el 99% o más de una muestra se compone del péptido. Los ejemplos de métodos que pueden usarse para purificar un péptido incluyen, pero no se limitan a los métodos dados a conocer en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, cap. 17). La pureza de la
- 10 proteína puede determinarse mediante, por ejemplo, electroforesis en gel de poli(acrilamida) de una muestra de proteína, seguido por visualización de una única banda de péptido tras la tinción del gel de poli(acrilamida); cromatografía de líquidos a alta presión; secuenciación; u otros métodos convencionales.

- Recombinante: Una molécula de ácido nucleico o proteína recombinante es una que tiene una secuencia que no se produce de manera natural, tiene una secuencia que se prepara mediante una combinación artificial de dos
- 15 segmentos de secuencia separados de otra forma, o ambos. Esta combinación artificial puede lograrse, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácido nucleico o proteínas, tal como técnicas de ingeniería genética. Recombinante también se usa para describir moléculas de ácido nucleico que se han manipulado artificialmente, pero contienen las mismas secuencias reguladoras y regiones codificantes que se encuentran en el organismo a partir del cual se aisló el ácido nucleico.

- 20 Identidad/similitud de secuencia: La identidad/similitud entre dos o más secuencias de ácido nucleico, o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en cuanto a la identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia puede medirse en cuanto al porcentaje de identidad; cuanto mayor es el porcentaje, más idénticas son las secuencias. La similitud de secuencia puede medirse en cuanto al porcentaje de similitud (que tiene en cuenta sustituciones de aminoácidos conservativas); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las secuencias.
- 25 Homólogos u ortólogos de secuencias de ácido nucleico o aminoácidos presentan un grado relativamente alto de identidad/similitud de secuencia cuando se alinean usando métodos convencionales.

- Se conocen bien en la técnica métodos de alineación de secuencias para comparación. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins & 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.*, Met. Mol. Bio. 24:307-31, 1994. Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990, presentan una consideración detallada de métodos de alineación de secuencias y cálculos de homología.
- 30

- La herramienta de búsqueda de alineación local básica (*Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST) del NCBI (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990) está disponible de 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 su uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Puede encontrarse información adicional en el sitio web del NCBI.
- 35

- BLASTN se usa para comparar secuencias de ácido nucleico, mientras que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. Para comparar dos secuencias de ácido nucleico, las opciones pueden ajustarse tal como sigue: -i se ajusta a un archivo que contiene la primera secuencia de ácido nucleico que va a compararse (tal como C:\seq1.txt); -j se ajusta a un archivo que contiene la segunda secuencia de ácido nucleico que va a compararse (tal como C:\seq2.txt); -p se ajusta a blastn; -o se ajusta a cualquier nombre de archivo deseado (tal como C:\output.txt); -q se ajusta a -1; -r se ajusta a 2; y todas las otras opciones se dejan en su parámetro por defecto. Por ejemplo, puede usarse el siguiente comando para generar un archivo de salida que contiene una comparación entre dos secuencias: C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q -1 -r 2.
- 40
- 45

- Para comparar dos secuencias de aminoácidos, las opciones de B12seq pueden ajustarse tal como sigue: -i se ajusta a un archivo que contiene la primera secuencia de aminoácidos que va a compararse (tal como C:\seq1.txt); -j se ajusta a un archivo que contiene la segunda secuencia de aminoácidos que va a compararse (tal como C:\seq2.txt); -p se ajusta a blastp; -o se ajusta a cualquier nombre de archivo deseado (tal como C:\output.txt); y todas las otras opciones se dejan en su parámetro por defecto. Por ejemplo, puede usarse el siguiente comando para generar un archivo de salida que contiene una comparación entre dos secuencias de aminoácidos: 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 archivo de salida designado presentará esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos
- 50
- 55
- secuencias comparadas no comparten homología, entonces el archivo de salida designado no presentará secuencias alineadas.

Una vez alineadas, se determina el número de coincidencias contando el número de posiciones en las que está presente un residuo de aminoácido o nucleótido idéntico en ambas secuencias. La identidad de secuencia en tanto por ciento se determina dividiendo el número de coincidencias o bien entre la longitud de la secuencia expuesta en

la secuencia identificada, o bien entre una longitud articulada (tal como 100 residuos de aminoácido o nucleótidos consecutivos a partir de una secuencia expuesta en una secuencia identificada), seguido por 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 prueba que tiene 1554 nucleótidos es idéntica al 75,0 por ciento a la secuencia de prueba ($1166 \div 1554 \times 100 = 75,0$). El valor de identidad de secuencia en tanto por ciento se redondea a la decena más cercana. Por ejemplo, 75,11, 75,12, 75,13 y 75,14 se redondean a 75,1, mientras que 75,15, 75,16, 75,17, 75,18 y 75,19 se redondean a 75,2. El valor de longitud será siempre un número entero.

Para comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30 aminoácidos, se emplea la función de secuencias de Blast 2 usando la matriz BLOSUM62 por defecto ajustada a parámetros por defecto (coste de existencia de huecos de 11, y un coste de hueco por residuo de 1). Los homólogos se caracterizan normalmente por la posesión de una identidad de secuencia de al menos el 70% contada a lo largo de la alineación de longitud completa con una secuencia de aminoácidos usando el programa NCBI Basic Blast 2.0, blastp con huecos con bases de datos tales como la base de datos nr o swissprot. Las consultas realizadas con el programa blastn se filtran con DUST (Hancock y Armstrong, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:67-70). Otros programas usan SEG. Además, puede realizarse una alineación manual. Las proteínas con una similitud incluso mayor mostrarán porcentajes de identidad crecientes cuando se evalúan mediante este método, tal como una identidad de secuencia de al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% con la secuencia sujeto (es decir una secuencia identificada mediante un número de registro o similar), mientras que retiene la actividad de la secuencia sujeto. En algunos ejemplos, la secuencia sujeto 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), la alineación debe realizarse usando la función de secuencias de Blast 2, empleando la matriz PAM30 ajustada a parámetros por defecto (penalizaciones por hueco abierto de 9, por extensión de hueco de 1). Proteínas con similitud incluso mayor con la secuencia de referencia mostrarán porcentajes de identidad crecientes cuando se evalúan mediante este método, tal como una identidad de secuencia de al menos el 60%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%; el 95%, el 98%, el 99%. Cuando se compara menos que la secuencia completa para determinar la identidad de secuencia, los homólogos presentarán normalmente una identidad de secuencia de al menos el 75% a lo largo de ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y pueden presentar identidades de secuencia de al menos el 85%, el 90%, el 95% o el 98% dependiendo de su identidad con la secuencia de referencia. Se describen métodos para determinar la identidad de secuencia a lo largo de tales ventanas cortas en el sitio web del NCBI.

No obstante, secuencias de ácido nucleico que no muestran un alto grado de identidad pueden codificar para secuencias de aminoácidos 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 para sustancialmente la misma proteína. Tales secuencias de ácido nucleico homólogas pueden presentar, por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% con respecto a una secuencia sujeto (secuencias identificadas mediante un número de registro o similar).

Un experto en la técnica apreciará que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan para orientación sólo; es posible que pudieran obtenerse homólogos fuertemente significativos que se encontrarán fuera de los intervalos proporcionados.

Célula transformada: Una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ácido nucleico de succinilCoA homoserina aciltransferasa, o una de homocisteína sintasa, por ejemplo mediante técnicas de biología molecular. La transformación engloba todas las técnicas mediante las que una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula de este tipo, incluyendo, pero sin limitarse a, transfección con vectores virales, conjugación, transformación con vectores de plásmido e introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas.

Actividad de trans-sulfuración: Una actividad que produce metionina o SAME por medio del producto 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 se codifican 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 presente actividad de trans-sulfuración.

En condiciones que permiten la producción de producto: Cualquier condición de fermentación que permita a un microorganismo producir 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 la metabolización de la fuente de carbono. Para determinar si las condiciones de cultivo permiten la producción de producto, el microorganismo puede cultivarse durante 24, 36 ó 48 horas y puede tomarse una muestra. Las células en la muestra pueden someterse a prueba entonces para determinar la presencia del producto deseado. Por ejemplo cuando se someten a prueba para detectar la presencia de metionina o SAME pueden usarse los ensayos proporcionados en la sección de ejemplos.

Vector: Una molécula de ácido nucleico tal como se introduce en una célula, produciendo de ese modo una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que permiten que se replique en la célula, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

5 Descripción detallada

I. Rutas de producción de metionina

Tal como se muestra en la figura 1, pueden usarse muchas rutas de biosíntesis para producir metionina o sus productos intermedios tales como aspartilfosfato, aspartato semialdehído homoserina, O-succinilhomoserina (OSHS), O-acetilhomoserina (OAHS), cistationina, homocisteína, metionina y S-adenosilmetionina (SAME). Para los fines de esta divulgación, un producto intermedio puede denominarse reactante o producto, dependiendo del contexto. Por ejemplo, cuando se comenta la conversión de aspartato en aspartilfosfato usando una aspartato cinasa, el aspartato es el reactante y el aspartilfosfato es el producto. De manera similar, cuando la descripción describe la conversión de aspartilfosfato en aspartato semialdehído usando una aspartato semialdehído deshidrogenasa, el aspartilfosfato es el reactante y el aspartato semialdehído es el producto. Un experto habitual en la técnica apreciará que la figura 1 muestra muchas rutas de biosíntesis porque dentro de cada clase de enzima proporcionada hay muchas enzimas que pueden usarse para convertir un reactante en un producto y, por tanto, realizar una ruta. Además, estas reacciones pueden llevarse a cabo *in vivo*, *in vitro* o a través de una combinación de reacciones *in vivo* y reacciones *in vitro*, tales como reacciones *in vitro* que incluyen reacciones químicas no enzimáticas.

También pueden proporcionarse productos intermedios al microorganismo huésped en la ruta incluyendo los productos intermedios en la materia prima de fermentación. Por tanto, si la ruta de biosíntesis está produciendo menos de una cantidad deseada de un producto intermedio dado, ese producto intermedio puede añadirse a la materia prima. Esto puede realizarse o bien en un entorno de fermentación continua o bien en un entorno de fermentación discontinua.

Los expertos habituales en la técnica reconocerán que un huésped de producción puede usar 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 modificarán la fuente de carbono en el medio de fermentación.

A. De glucosa a aspartato

Los microorganismos generalmente producen aspartato a partir de glucosa. Un experto habitual en la técnica apreciará que hay muchos métodos de aumento de la concentración de aspartato en cepas de producción. Por ejemplo, aumentar la expresión de las enzimas piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa, alterar la derivación de glioxilato o eliminar el consumo de piruvato para dar otros productos tales como acetato o etanol.

Alternativamente, puede incluirse aspartato en la materia prima de fermentación, captarse por el microorganismo y usarse como reactante en la ruta de biosíntesis de metionina.

El aspartato también sirve como producto intermedio en las rutas de biosíntesis de lisina, treonina y asparagina. Por tanto, puede ser deseable atenuar o eliminar (desactivar) estas rutas, permitiendo así que se use más aspartato en la ruta de producción de metionina.

B. De aspartato a aspartilfosfato

Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir aspartilfosfato, o para sobreproducir aspartilfosfato. Por ejemplo, puede usarse la aspartato cinasa resistente a la retroalimentación descrita en el documento WO04069996A2 para reemplazar a una aspartato cinasa endógena o además de a una aspartato cinasa endógena.

Tal como se usa en el presente documento, aspartato cinasa incluye péptidos en el número de clasificación de enzimas (EC) 2.7.2.4, así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de aspartato en aspartilfosfato. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica 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 tanto, tales péptidos de aspartato cinasa no específicos también se incluyen. Las secuencias de aspartato cinasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los n.^{os} de registro de GenBank: NZ_AAVY01000022, NC_006958 y NZ_AAWW01000055 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de aspartato cinasa y los n.^{os} de registro de GenBank: NP_418448, NP_599504 y ZP_01638096 dan a conocer secuencias de péptido de aspartato cinasa. Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad aspartato cinasa de un péptido particular. Por ejemplo, el ensayo descrito por Cohen, GN, *Methods in Enzymology*, 113:596:600, 1985, puede usarse para caracterizar la actividad de un péptido específico.

C. De aspartilfosfato a aspartato semialdehído

Los huéspedes de producción pueden modificarse por ingeniería genética usando polipéptidos conocidos para producir aspartato semialdehído, o para sobreproducir aspartato semialdehído. Un método de aumento de la producción de productos en la ruta de biosíntesis de metionina es a través de sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de aspartato semialdehído deshidrogenasa.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, aspartato semialdehído deshidrogenasa incluye péptidos de aspartato semialdehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.11), así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de aspartilfosfato en aspartato semialdehído. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos de aspartato semialdehído deshidrogenasa catalizarán otras reacciones también. Por ejemplo, algunos péptidos de aspartato semialdehído deshidrogenasa aceptarán otros sustratos además de aspartilfosfato, y por tanto, también se incluyen tales péptidos de aspartato semialdehído deshidrogenasa no específicos. Las secuencias de aspartato semialdehído deshidrogenasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los n.^{os} de registro de GenBank: NC_006958, NZ_AAVY01000015 y NZ_AAWW01000010 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de aspartato semialdehído deshidrogenasa y los n.^{os} de registro de GenBank: NP_417891, NP_599505 y ZP_0164))72 dan a conocer secuencias de péptido de aspartato semialdehído deshidrogenasa. Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad aspartato semialdehído deshidrogenasa de un péptido particular. Por ejemplo, el ensayo descrito por Cohen, GN., *Methods in Enzymology*, 113:600-602, 1985, puede usarse para caracterizar la actividad de un péptido específico.

D. De aspartato semialdehído a homoserina

- 20 Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir homoserina, o para sobreproducir homoserina. Un método de aumento de la producción de productos en la ruta de biosíntesis de metionina es a través de la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de aspartato semialdehído deshidrogenasa.

- 25 Tal como se usa en el presente documento, homoserina deshidrogenasa incluye péptidos de homoserina deshidrogenasa (EC 1.1.1.3), así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de aspartato semialdehído en homoserina. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos de homoserina deshidrogenasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de homoserina deshidrogenasa aceptarán otros sustratos además de aspartato semialdehído. Por tanto tales péptidos de homoserina deshidrogenasa no específicos se incluyen también. Las secuencias de péptidos de homoserina deshidrogenasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los n.^{os} de registro de GenBank: NC_006958, NZ_AAVY01000013 y NZ_AAWW01000033 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de homoserina deshidrogenasa y los n.^{os} de registro de GenBank: NP_414543, ZP_01639819 y NP_600409 dan a conocer secuencias de péptidos de homoserina deshidrogenasa. Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad homoserina deshidrogenasa de un péptido particular. 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.

35 E. De homoserina a O-succinilhomoserina (OSHS)

- Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir O-succinilhomoserina (OSHS), o para sobreproducir OSHS. Un método de aumento de la producción de productos en la ruta de biosíntesis de metionina es a través de la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa péptidos de homoserina O-succiniltransferasa, o usando una forma insensible a la inhibición por retroalimentación de péptidos de homoserina O-succiniltransferasa.

- 40 Tal como se usa en el presente documento, succinilCoA homoserina aciltransferasa incluye péptidos de homoserina O-succiniltransferasa (EC 2.3.1.46), así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de homoserina en OSHS. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica 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 homoserina. Por tanto, tales péptidos de succinilCoA-homoserina aciltransferasa no específicos se incluyen también. Las secuencias de péptidos de homoserina O-succiniltransferasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, el n.^o de registro de GenBank: NZ_AAWW01000055 da a conocer una secuencia de ácido nucleico de homoserina O-succiniltransferasa y el n.^o de registro de GenBank: AAC76983 da a conocer una secuencia de péptido de homoserina O-succiniltransferasa. Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad succinilCoA-homoserina aciltransferasa. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito por Lawrence, J. *Bacteriol.*, 109:8-11, 1972, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos de succinilCoA-homoserina aciltransferasa también se denominan en el presente documento *metA*.

F. De homoserina a O-acetilhomoserina (OAHS)

- 55 Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir O-acetilhomoserina (OAHS), o para sobreproducir OAHS. Un método de aumento de la producción de productos en la ruta de biosíntesis de metionina es a través de la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos de homoserina O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31).

Tal como se usa en el presente documento, homoserina O-acetiltransferasa incluye péptidos de homoserina O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31), así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión en OAHS. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica 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 homoserina. Por tanto, tales péptidos de homoserina O-acetiltransferasa no específicos se incluyen también. Las secuencias de péptidos de homoserina O-acetiltransferasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los n.^{os} de registro de 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 n.^{os} de registro de GenBank: CAA71733, ZP_00766367 y ZP_00107218 dan a conocer secuencias de péptidos de homoserina O-acetiltransferasa. Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad 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. Los genes que codifican péptidos de homoserina O-acetiltransferasa también se denominan en el presente documento *metX*.

G. Sulfhidrilación

La producción de homocisteína mediante sulfhidrilación directa se logra 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 o bien OSHS o bien OAHS como sustratos.

1. De O-succinilhomoserina (OSHS) a homocisteína

Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o para sobreproducir homocisteína. Un método de aumento de la producción de productos en la ruta de biosíntesis de metionina es a través de la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos de homocisteína sintasa (EC 4.2.99.-).

Tal como se usa en el presente documento, homocisteína sintasa incluye péptidos de homocisteína sintasa (EC 4.2.99.-), así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de O-succinilhomoserina (OSHS) en homocisteína. La conversión de OSHS en homocisteína a través de reacción con sulfuro se denomina en el presente documento sulfhidrilación directa. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos de homocisteína sintasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de homocisteína sintasa aceptarán otros sustratos además de OSHS. Por tanto, tales péptidos de homocisteína sintasa no específicos se incluyen también. Las secuencias de péptidos de homocisteína sintasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, el n.^o de registro de GenBank: AE004091 da a conocer secuencias de ácido nucleico de homocisteína sintasa (O-succinil-L-homoserina sulfhidrilasa) y el n.^o de registro de GenBank: AAG06495 da a conocer una secuencia de aminoácidos de homocisteína sintasa (O-succinil-L-homoserina sulfhidrilasa). Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad 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. Los genes que codifican péptidos de homocisteína sintasa también se denominan en el presente documento *metZ*.

2. De O-acetilhomoserina (OAHS) a homocisteína

Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o para sobreproducir homocisteína. Un método de aumento de la producción de productos en la ruta de biosíntesis de metionina es a través de la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos de homocisteína sintasa (EC 2.5.1.49).

Tal como se usa en el presente documento, homocisteína sintasa incluye péptidos de homocisteína sintasa (EC 2.5.1.49), así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de O-succinilhomoserina (OAHS) en homocisteína. La conversión de OAHS en homocisteína a través de la reacción con sulfuro se denomina en el presente documento sulfhidrilación directa. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos de homocisteína sintasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de homocisteína sintasa aceptarán otros sustratos además de OSHS, por ejemplo la homocisteína sintasa descrita en el ejemplo 2 más adelante acepta o bien OAHS o bien OSHS como sustrato, por tanto, tales péptidos de homocisteína sintasa no específicos se incluyen también. Las secuencias de péptidos de homocisteína sintasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los n.^{os} de registro de 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.^{os} de registro de GenBank: AAG08410, CAA71732, ZP_00766366, y ZP_00107219 dan a conocer secuencias de aminoácidos de homocisteína sintasa (O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa). Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad 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. Los genes que codifican péptidos de homocisteína sintasa también se denominan en el presente documento *metY*.

H. Trans-sulfuración

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

Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir cistationina, o para sobreproducir cistationina. Un método de aumento de la producción de productos en la ruta de biosíntesis de metionina es a través de la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos de cistationina γ -sintasa (EC 2.5.1.48).

Tal como se usa en el presente documento, cistationina γ -sintasa incluye péptidos de cistationina γ -sintasa (EC 2.5.1.48), así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de OSHS u OAHS en cistationina. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica 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 tanto, tales péptidos de cistationina γ -sintasa no específicos se incluyen también. Las secuencias de péptidos de cistationina γ -sintasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los n.^{os} de registro de GenBank: NC_006958, NZ_AAWW01000006 y NC_004129 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de cistationina γ -sintasa y los n.^{os} de registro de GenBank: NP_418374, YP_348978 y NP_601979 dan a conocer secuencias de péptidos de cistationina γ -sintasa. Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad 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. Los genes que codifican péptidos de cistationina γ -sintasa también se denominan en el presente documento *metB*.

2. De cistationina a homocisteína

Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o para sobreproducir homocisteína. Un método de aumento de la producción de productos en la ruta de biosíntesis de metionina es a través de la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos de cistationina β -liasa (EC 4.4.1.8).

Tal como se usa en el presente documento, cistationina β -liasa incluye péptidos de cistationina β -liasa (EC 4.4.1.8), así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de cistationina en homocisteína. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica 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 cistationina. Por tanto, tales péptidos de cistationina β -liasa no específicos se incluyen también. Las secuencias de péptidos de cistationina β -liasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los n.^{os} de registro de GenBank: NZ_AAWW01000001, NC_006958 y NZ_AAVY01000004 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de cistationina β -liasa y los n.^{os} de registro de GenBank: NP_746463, YP_226552 y NP_417481 dan a conocer secuencias de péptidos de cistationina β -liasa. Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad 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. Los genes que codifican péptidos de cistationina β -liasa también se denominan en el presente documento *metC*.

I. De homocisteína a metionina

Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir metionina, o para sobreproducir metionina. Un método de aumento de la producción de productos, tales como metionina o SAME en la ruta de biosíntesis de metionina es a través de la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos de homocisteína metliasa (EC 2.1.1.14 y 2.1.1.13).

Tal como se usa en el presente documento, homocisteína metliasa incluye péptidos de homocisteína metliasa (EC 2.1.1.14, y 2.1.1.13), así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de homocisteína en metionina. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos de homocisteína metliasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de homocisteína metliasa aceptarán otros sustratos además de homocisteína. Por tanto, tales péptidos de homocisteína metliasa no específicos se incluyen también. Las secuencias de péptidos de homocisteína metliasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los n.^{os} de registro de GenBank: NC_004129, NC_006958 y NC_000913 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de homocisteína metliasa y los n.^{os} de registro de GenBank: AP_004520, YP_225791 y CAK16133 dan a conocer secuencias de péptidos de homocisteína metliasa. Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad homocisteína metliasa 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. Los genes que codifican péptidos de homocisteína metliasa se denominan también en el presente documento *metH* o *metE*.

J. De metionina a S-adenosilmetionina

Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir S-adenosilmetionina (SAME), o para sobreproducir SAME. Un método de aumento de la producción de productos, en

la ruta de biosíntesis de metionina, es a través de la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos de metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6). Un experto habitual en la técnica apreciará que en casos en los que la metionina es el producto deseado, la actividad o expresión de péptidos de metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6) codificados por *metK* puede atenuarse.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, metionina adenosiltransferasa incluye péptidos de metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6), así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de metionina en SAME. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos de metionina adenosiltransferasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo algunos péptidos de metionina adenosiltransferasa aceptarán otros sustratos además de metionina. Por tanto, tales péptidos de metionina adenosiltransferasa no específicos se incluyen también. Las secuencias de péptidos de metionina adenosiltransferasa están disponibles públicamente. Por ejemplo, los n.^{os} de registro de GenBank: NC_002516, NC_006958 y NC_000913 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de metionina adenosiltransferasa y los n.^{os} de registro de GenBank: NP_747070, CAI37180 y NP_600817 dan a conocer secuencias de péptidos de metionina adenosiltransferasa. Se conocen bien en la técnica ensayos para caracterizar la actividad 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. Los genes que codifican metionina adenosiltransferasa también se denominan en el presente documento *metK*.

II. Modificación por ingeniería genética de la cepa de producción para aumentar la producción de metionina

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

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

- 30 El gen *metA* codifica homoserina succiniltransferasa que es la primera enzima en la ruta de biosíntesis de metionina a partir de homoserina y un punto de regulación para la producción de metionina. La proteína de *metA* es una proteína sensible a la temperatura de 186 residuos de aminoácido con una masa molecular calculada de 35,7 kDa. Se sabe 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 mediante estos dos productos es sinérgica, lo que significa que bajas concentraciones de cada metabolito solo son sólo ligeramente inhibidoras, mientras que en combinación se ejerce una fuerte inhibición. Por tanto, una cepa de producción podría beneficiarse de una actividad MetA resistente a la inhibición por retroalimentación.

- 35 Otro gen que puede atenuarse o deleccionarse 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*.

- 40 La proteína codificada por el gen *metF*, 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa, está implicada en la síntesis de N(5)-metiltetrahidrofolato que es un donador de grupos metilo para la producción de L-metionina a partir de homocisteína (Sheppard *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*. Por consiguiente, los microorganismos modificados por ingeniería genética descritos en el presente documento también pueden modificarse por ingeniería genética para aumentar la producción de *metF*.

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

- 50 La formación de SAME disminuye la concentración de metionina y reduce la actividad de la ruta de biosíntesis de metionina por medio de inhibición por retroalimentación de MetA. Por tanto, la delección o atenuación funcional de *metK* puede aumentar la producción de metionina.

- 55 Un experto habitual en la técnica apreciará que la eficacia de utilización de azufre por cualquier célula que está produciendo metionina es importante. Esto es especialmente cierto para microorganismos que utilizan fosfoadenilil sulfato (PAPS) como producto intermedio durante la asimilación de azufre, debido a que la producción de 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 con el fin de usarse por la célula. En *E. coli* el sulfato se incorpora en la célula mediante un sistema de transporte periplasmático,

compuesto por tres componentes de la membrana citoplasmática y una proteína de unión específica de sustrato ubicada en el espacio periplásmico. Los tres componentes de la membrana de la sulfato permeasa están codificados por los genes *cysT*, *cysW* y *cysA* (locus *cysA*). Los productos del locus *cysA* se regulan conjuntamente con el resto de la ruta de asimilación de sulfato como parte del regulón *cys*. Entonces se activa el sulfato mediante acoplamiento a un nucleósido para producir fosfosulfatos de nucleósidos de alta energía por medio de una ruta que parece ser similar en la mayoría de los organismos.

Tal como se muestra en la figura 6, un microorganismo tal como *E. coli* utiliza una ruta que convierte el sulfato en adenililsulfato (APS) usando un péptido de sulfato adenilil transferasa (EC 2.7.7.4 codificado por *cysNcysD*). El APS se convierte entonces en PAPS mediante APS cinasa (EC 2.7.1.25 codificada por *cysC*). Esta etapa requiere un ATP. PAPS se convierte en sulfito mediante una PAPS reductasa (EC 1.8.4.8 codificada por *cysH*) y el sulfito se reduce a sulfuro mediante NADPH-sulfito reductasa (EC 1.8.1.2 codificada por *cys/cysJcysG*). La ruta alternativa, mostrada en el lado derecho de la figura 6, convierte APS directamente en sulfito usando una adenililsulfato reductasa (EC 1.8.9.92 ó 1.8.4.9). Un experto habitual en la técnica apreciará que funcionará cualquier adenililsulfato reductasa que pueda convertir APS en sulfito. Por ejemplo, la adenililsulfato reductasa de *Bacillus subtilis* (número de registro CAA04409), o de *Pseudomonas aeruginosa* (número de registro NP_250447).

Pueden introducirse secuencias de ácido nucleico que codifican adenililsulfato reductasa en cualquier microorganismo usado para producir metionina. Por ejemplo las cepas descritas en el presente documento, así como las cepas descritas en los documentos WO2005/108561 y WO2006/138689 de Metabolic Explorer, y las descritas por Kumar y Gomes, *Biotechnology Advances* 23:41-61, 2005, pueden beneficiarse de la ruta dada a conocer que sortea PAPS y por tanto requiere una molécula de ATP menos para la asimilación del sulfato.

Ejemplos

Ejemplo 1: Rutas de producción de metionina múltiples, una de las cuales usa sulfhidrilación directa, usando secuencias de ácido nucleico expresadas de manera exógena

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

Tal como se describió anteriormente, la producción endógena de metionina en *E. coli* se produce principalmente a través de la reacción de transulfuración. Este ejemplo describe la modificación por ingeniería genética de *E. coli* para aumentar la sulfhidrilación directa al tiempo que también se mantiene la ruta de *metABC* endógena.

Se aumentó la sulfhidrilación directa clonando O-succinilsulfhidrilasa (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 se derivó de la cepa de producción de treonina TF4076 (modificada adicionalmente mediante la delección de *thrB* y *metJ*, y la inserción de *metF* bajo el control del promotor pTrc, descrito adicionalmente en el ejemplo 3, más adelante). Estos auxótrofos tienen una delección de los genes o bien *metB* o bien *metB* y *metC*. *metZ* de *Pseudomonas aeruginosa* potenció el crecimiento de los mutantes por delección de *metB* y *metBC* en medio mínimo. Aun cuando en cultivos en frasco la producción de metionina no se recuperaba completamente, la expresión de *metZ* induce la producción de metionina hasta ~100 mg/l en el mutante por delección de *metBC*, tal 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 por delección transformados con *metZ* puede deberse a la limitación de sulfuro en la fracción intracelular (a continuación se proporcionan métodos de aumento de la concentración de sulfuro). Esto está apoyado por el hallazgo de que el crecimiento de la cepa por delección de *metBC* transformada con *metZ* se potenció en medios M9 en presencia de sulfuro de sodio 2 mM. En ensayos *in vitro*, la O-succinilsulfhidrilasa tenía una baja afinidad por sulfuro. A través de evolución dirigida, es posible desarrollar O-succinilsulfhidrilasas mejoradas con mayor afinidad por sulfuro y también mayor actividad. Una O-succinilsulfhidrilasa altamente activa puede reemplazar a *metB* y *metC* en la ruta de metionina, o puede complementar la ruta para aumentar el flujo de carbono a la metionina.

[Tabla 1]

Complementación del crecimiento y producción de metionina en TF4076BFJ-ΔBC

TF4076BJF-ΔBC	DO	glucosa usada (g/l)	producto intermedio de 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)

- 5 B. Construcción de un microorganismo que tiene tanto *metABC* (trans-sulfuración) como *metXY* (sulfhidrilación directa)

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

- 10 Tal como se muestra en la figura 1, *E. coli* produce metionina de manera endógena usando los genes de la ruta de trans-sulfuración *metA*, *metB* y *metC* y discurre a través de OSHS. Se usó modificación por ingeniería genética para añadir una ruta adicional a *E. coli* clonando y expresando los genes *metX* y *metY* en *E. coli*, lo que dio como resultado un organismo huésped que producía metionina a través tanto de trans-sulfuración como de sulfhidrilación directa simultáneamente.

- 15 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* tal 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. También se clonaron y se sometieron a prueba 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.

- 20 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 la agrupación génica *metYX* de *L. meyeri* a partir 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* ubicado en el vector.

- 25 Se evaluaron cuatro cepas de *E. coli* incluyendo W3110 $\Delta metA$ (producción detenida de OSHS), TF4076BJF (producción de homoserina aumentada), TF4076BJF $\Delta metA$ (producción detenida de OSHS) y TF4076BJF $\Delta metA metB$ (producción detenida de OSHS y cistationina a partir de OAHS u OSHS). La cepa TF4076BJF es un auxótrofo de treonina, desregulada para la producción de metionina con un aumento del flujo de carbono hasta homoserina, que puede producir metionina a través de la ruta de *E. coli* natural.

- 30 Se transformaron las cepas con el vector de clonación y el plásmido que contenía *metYX*, respectivamente. Entonces se cultivaron en línea los transformantes sobre placas de medio mínimo M9 que contenían glucosa (2 g/l), isoleucina (0,15 g/l), treonina (0,3 g/l), kanamicina (50 mg/l) e IPTG. La agrupación génica *metYX* de *Leptospira meyeri* complementó el crecimiento de W3110 $\Delta metA$ en el plazo de 24 h. La cepa W3110 $\Delta metA$ que sólo expresa *metX* no pudo crecer sobre la placa de medio mínimo M9. Por tanto, *E. coli* W3110 carece de una enzima eficaz para usar O-acetil-L-homoserina como precursor para la biosíntesis de metionina. La cepa W3110 $\Delta metA$ transformada con el vector vacío control, pPRO-Nde-del, tal como se describe en el documento WO2006113897, no creció en el plazo de 48 h. La cepa TF4076BJF creció sobre las placas de medio mínimo cuando se transformó o bien con el vector de clonación o bien con el plásmido que contenía *metYX* de *L. meyeri*.

- 40 También se sometieron a prueba genes *metYX* alternativos para determinar la complementación del crecimiento en medio mínimo. En la clonación de los genes *metYX* de *D. radiodurans*, *C. aurantiacus*, *B. linens*, *N. punctiforme*, se acopló la traducción del gen *metX* con la traducción del gen *metY* iniciada por un rbs ubicado en el vector, debido a la ausencia de un sitio de unión al ribosoma (rbs) de *E. coli* eficaz adyacente al gen en el sentido de 3', *metX*.

- 45 La agrupación génica *metYX* de *L. meyeri*, *D. radiodurans* y *C. aurantiacus* fueron las más eficaces en la complementación del crecimiento de las cepas auxótrofas para metionina. También se observó complementación del crecimiento en un auxótrofo de metionina en el que se reemplazó *metY* (*L. meyeri*) por *metY* (*P. aeruginosa*) en la agrupación génica *metYX* de *L. meyeri*. Estas células mostraron una tasa de crecimiento reducida en relación con el mismo auxótrofo de metionina que expresa el *metYX* de *L. meyeri*.

- 50 Se determinó la producción de metionina usando el protocolo de frasco de agitación descrito en el ejemplo 3. En resumen, se hicieron crecer los cultivos a 30°C durante 50 horas en el medio complementado con 150 mg/l de metionina (para mejorar el crecimiento inicial) y se midió la metionina mediante HPLC. La tabla 2 muestra que la producción de metionina era superior en las cepas que portaban ambas rutas en comparación con aquéllas en las que sólo estaba disponible la trans-sulfuración o la sulfhidrilación directa.

[Tabla 2]

Producción de metionina

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

Los genes *metA* y *metB* son necesarios para la síntesis de metionina en cepas de *E. coli*. Cuando uno cualquiera de los genes se inactiva, *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 hasta niveles similares a los obtenidos con un protótipo de metionina. En algunos casos la producción de metionina fue de más del doble cuando ambas rutas estaban disponibles para la célula. Estos resultados demuestran que las rutas no son mutuamente excluyentes y que la homoserina se convierte en metionina por medio de ambas rutas.

Para demostrar adicionalmente los beneficios de la ruta doble, se compararon las cepas en recipientes de fermentación de 5 litros usando el protocolo de fermentación descrito en el ejemplo 3. La acumulación de metionina comenzó tras aproximadamente 24 horas y continuó hasta que se detuvo la alimentación. La enzima codificada por el gen *metY* de la mayoría de los organismos se inhibe por retroalimentación por altas concentraciones de metionina. En algunos casos, la enzima codificada por el gen *metX* también se inhibe por retroalimentación. Como resultado, se observó una acumulación significativa de homoserina y OAHS en estas fermentaciones. En la figura 2 se muestra una comparación de la producción de metionina en fermentadores y los datos se resumen en la tabla 3. Estos resultados confirmaron la observación realizada en los frascos de que la producción de metionina podía potenciarse significativamente mediante la expresión adecuada 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.

[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</i> (Lm)	4,7	7,7
TF4076BJF <i>metY</i> (Pa) <i>metX</i> (Lm)	1,5	20,0
TF4076BJF <i>metYX</i> (Dr)	4,7	32,4
TF4076BJF <i>metYX</i> (Ca)	4,9	20,7
TF4076BJF Δ <i>metA</i> <i>metYX</i> (Lm)	4,1	6,2

Para aumentar el flujo de productos hasta metionina, puede usarse un *metY* y un *metX* que son resistentes a la inhibición por retroalimentación. También es posible regular el nivel de expresión de *metX* y la expresión de *metH* para dirigir la homoserina más rápido a 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 ésta puede dar como resultado más del doble de acumulación de metionina.

Ejemplo 2: Homocisteína sintasa que usa o bien O-acetil-L-homoserina (OAHS) o bien O-succinil-L-homoserina (OSHS)

Este ejemplo describe los métodos usados para aislar una homocisteína sintasa codificada por *metY* 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 método se modificó ligeramente porque se tomaron múltiples puntos de muestras, se usó guanidina para extinguir la reacción y se detectó la formación de homocisteína usando DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) Sigma D8130) como en el análisis para detectar *metA* descrito en el ejemplo 3.B. Se definió una unidad de enzima (U) como la formación de un μ mol de homocisteína por minuto a temperatura ambiente.

Se expresó MetY de *P.* y se analizó usando 17,5 μ g de proteína purificada (etiquetada con N). En contraposición a *metY* de *L. meyeri* y a la mayoría de las demás homocisteína sintasas publicadas, esta enzima era activa tanto con

acetil como con succinil-homoserina. La actividad era similar para ambos sustratos, se inhibía por retroalimentación mediante metionina y SAME y el nivel de inhibición por retroalimentación parecía ser ligeramente inferior cuando el sustrato era OSHS. Se observó algo de inhibición a metionina 1 mM. Con OAHS como sustrato, a 10, 50 y 100 mM la enzima conservaba aproximadamente el 50%, el 19% y el 9%, respectivamente, de la actividad que tenía en ausencia de metionina. La actividad en presencia de SAME 5 y 10 mM era de aproximadamente el 72% y el 21% de la actividad original. Cuando el sustrato era OSHS la actividad disminuyó hasta el 53% y el 31% en presencia de metionina 50 y 100 mM y hasta el 86% y el 19% en presencia de SAME 5 y 10 mM.

Ejemplo 3: Métodos de modificación por ingeniería genética de cepas huésped para aumentar la producción de metionina

Además de añadir rutas de biosíntesis de metionina a organismos huésped tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, el organismo huésped puede modificarse por ingeniería genética adicionalmente para disminuir la inhibición de la ruta de biosíntesis de metionina, aumentar la disponibilidad de reactantes y/o disminuir el catabolismo de productos.

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

Un método de preparación de una cepa de producción de metionina es modificar una cepa que ya se ha modificado por ingeniería genética 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 n.º 92-8365 (KFCC 10718), aun cuando es un auxótrofo de metionina. Las cepas a modo de ejemplo adicionales incluyen las depositadas en la ATCC (13070, 13071, 21148, 21149, 21150, 21151, 21272, 21277, 21278, 21318, 21319, 21320) que se describen como sobreproductoras de treonina.

Usando la cepa TF 4076 como punto de partida, se potenció la producción de metionina delecionando el gen *thrB* para evitar la producción de treonina y delecionando el gen *metJ* para liberar la represión de la expresión de la ruta de biosíntesis de metionina. También se modificó la cepa para sobreexpresar el gen *metF*.

Delección de thrB

Se delecionó *thrB* usando un casete loxP-cloranfenicol (loxP-Cm) (Gene 2000 vol. 247, págs. 255-264). Se clonó el gen *thrB* mediante PCR usando las secuencias de cebador 1 y 2 (SEQ ID NO: 5 y 6) usando el cromosoma de *E. coli* K12 como molde. Se usaron condiciones de PCR de 94°C durante 30 segundos; luego 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 y se clonaron en el kit de clonación pCR2.1-topo (Invitrogen, EE.UU.) y se nombró *pCR-thrB*. Se digirió *pCR-thrB* usando pflMI y se insertó el casete loxP-Cm. A partir de este plásmido, se amplificó por PCR el gen *thrB* que contenía el casete loxP-Cm usando los cebadores 1 y 2 (SEQ ID NO: 11 y 12). Se purificaron en gel los productos de PCR. Se introdujeron por electroporación los fragmentos de PCR dentro de la cepa TF4076 y se seleccionaron colonias resistentes a cloranfenicol y se confirmó la delección de *thrB*. Se eliminó el marcador de cloranfenicol de una colonia identificada y la cepa final obtenida se nombró TF4076B. Esta cepa no crecía sobre medio mínimo M9 (DIFCO) sin treonina, indicando que esta cepa es un auxótrofo de treonina.

1. *thrB* SEQ ID NO: 11

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

2. *thrB* SEQ ID NO: 12

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

Delección de metJ

Para delecionar el gen *metJ* represor global de metionina, se usó el método de delección en una etapa FRT (Datsenko y Wanner PNAS 97:6640-6645, 2000). Se amplificaron fragmentos de PCR usando las secuencias de cebador 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 por 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; luego 72°C durante 7 minutos, con premezcla de PCR HL (Bioneer Co., Corea). Se seleccionaron colonias resistentes a cloranfenicol y se confirmó la delección del gen *metJ* usando las secuencias de cebador de PCR 5 y 6 (SEQ ID NO: 15 y 16). Usando transformación con el plásmido pCP20, se eliminó el gen marcador de cloranfenicol y se confirmó la eliminación usando PCR. La cepa obtenida se nombró TF4076BJ.

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

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

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

5'-gtattccac gtctccgggt taatcccat ctcacgcatg atctccatat gaatacctc cttag-3'

5. *metJ* SEQ ID NO: 15

5'-gggctttgtc ggtgaaatg-3'

6. *metJ* SEQ ID NO: 16

5'-actttgcgat 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 de cebador 7 y 8 (SEQ ID NO: 17 y 18) y el cromosoma de la cepa de *E. coli* K12 como molde. Se usaron condiciones de PCR de 94°C durante 30 segundos, luego 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, y luego 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 *SacI* en el vector pSE380 (Invitrogen Co.). El plásmido se nombró pSE380-*metF*. Se transformó pSE380-*metF* en la cepa TF4076BJ. El transformante crecía sobre 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 fueron el promotor pCJ1 (documento PCT/KR2005/004338) y el promotor pThreonine. Se amplificó el gen *metF* usando las secuencias de cebador 9 y 10 (SEQ ID NO: 19 y 20) y el cromosoma de la cepa de *Escherichia coli* K12 como molde. Se usaron condiciones de PCR de 94°C durante 30 segundos, luego 25 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, 72°C durante 1 min, y luego 72°C durante 7 min y premezcla de PCR HL (Bioneer Co., Corea). Se eluyeron en gel los fragmentos de PCR y se ligaron en los sitios *PvuII* y *HindIII* en el vector pCL1920 (Lerner y 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 de cebador 11 y 12 (SEQ ID NO: 21 y 22) y se amplificó el promotor pThreonine a partir del cromosoma de *E. coli* K12 usando las secuencias de cebador 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 contenía en el gen *metF* bajo el control del promotor pCJ1 se nombró pCL-pCJ1-*metF* y el plásmido que contenía el gen *metF* bajo el control del promotor de pThreonine se nombró 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 frasco de agitación para someter a prueba las cepas tal como sigue: se incubó un cultivo simiente a 31°C durante 6 h en medio que consistía 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. Entonces se usó para inocular frascos 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 frascos durante de 64 a 72 horas a 31°C con agitación a 250 rpm. Tras la centrifugación, se aisló el sobrenadante de cultivo y se usó para el análisis de metionina.

Para el cultivo de células que contenían el plásmido pSE380-*metF*, se añadieron ampicilina 100 µg/l e IPTG 0,5 mM a los medios. El gen *metF* bajo el control del promotor pCJ1 produjo la mayor cantidad de metionina tal como se muestra en la tabla 4.

[Tabla 4]

Producción de metionina en células que contienen diversos casetes 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- <i>MetF</i>	7,4	35	206
TF4076BJ/pCL-pthr- <i>MetF</i>	22	40	136

Para expresar el gen *metF* de manera más estable, se integraron los genes *metF* bajo los 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 *Nsi*I en el vector pBrint (Borgne *et al.*, Gene 223:213-219, 1998). Se transformaron los vectores en la cepa TF4076BJ y se seleccionó un transformante que crecía en medios que contenían cloranfenicol a 37°C y se confirmó la integración del gen *metF* en el locus *LacZ* del cromosoma. Se transformaron colonias seleccionadas mediante pJW168 y se delecionó el marcador de cloranfenicol. No pudieron obtenerse células que contenían el gen pCJ1-*metF* y el transformante que contenía el casete pThr-*metF* no crecía bien. Sólo las células que contenían el gen pTrc-*metF* en el locus *LacZ* crecían bien. El cultivo en frasco de esta cepa mostró una producción de ~600 mg/l de metionina en presencia de IPTG 0,5 mM en los medios. La cepa final que contenía el gen pTrc-*metF* se nombró TF4076BJF y se analizó adicionalmente.

En resumen, se derivó la cepa TF4076BJF de la cepa productora de treonina TF 4076, 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 ttataaaccagggtcgaaccc-3'

9. *metF* SEQ ID NO: 19

5'-CAGCTGatgagcttttttcacgccag-3'

10. *metF* SEQ ID NO: 20

5'-AAGCTT ttataaaccagggtcgaaccc-3'

11. Promotor CJ1 SEQ ID NO: 21

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

12. Promotor CJ1 SEQ ID NO: 22

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

13. Promotor de treonina SEQ ID NO: 23

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

14. Promotor de treonina SEQ ID NO: 24

5'-cat gat atc tac ctg 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.

Se realizaron fermentaciones de 5 l usando el siguiente protocolo. Para comparar el efecto de los diferentes genes clonados en la cepa de *E. coli*, se usó un protocolo de fermentación básico para tarros de 5 litros. Se hizo crecer el inóculo en 25 ml de medio que consistía 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 estaba sometiéndose a prueba. Tras la incubación con agitación a 31°C y 250 rpm durante 8-24 horas, se transfirió el cultivo a 200 ml del mismo medio y se incubó en las mismas condiciones durante de 16 a 20 horas. Se usó este cultivo para inocular fermentadores con 2,5 l de medio.

El medio de fermentación consistía en: (NH₄)₂SO₄ 17,0 g/l, extracto de levadura 2,0 g/l, KH₂PO₄ 2,0 g/l, L-treonina 1,0 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 1,0 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 estaba haciéndose 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%. Tras agotarse la glucosa, el pH se aumentó. En ese momento, se inició una alimentación fija continua, o se añadieron alícuotas de 100 - 150 ml de alimentación de una vez, basándose en los aumentos en el pH. La alimentación consistía en extracto de levadura 4,0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 33 g/l, KH₂PO₄ 3,0 g/l, L-treonina 1,5 g/l, MgSO₄-7H₂O 1,0 g/l, vitamina B12 2 mg/l y glucosa 400 g/l. Se introdujeron algunas variaciones menores en el medio y la alimentación dependiendo de la cepa. La fermentación se realizó durante un total de 72 a 96 horas. Se midió la concentración de metionina a lo largo de todo el procedimiento, así como el crecimiento celular mediante densidad óptica y el uso de glucosa.

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

Se construyó una cepa de *E. coli* con los genes *metA* y *metB* deletados. Esta cepa mostró acumulación de homoserina debido a la pérdida de la actividad MetA. Cuando se expresó el casete de *metA* silvestre en esta cepa, se produjo OSHS por la actividad MetA en ausencia de metionina. Sin embargo, cuando se añadió metionina en los medios, la cepa con el casete de *metA* silvestre acumuló homoserina de nuevo debido a la inhibición por retroalimentación de la actividad MetA. Por tanto, pueden identificarse genes *metA* resistentes a la retroalimentación mediante pruebas para detectar la acumulación de O-succinilhomoserina en presencia de metionina. El mutante que produce más OSHS en presencia de una alta cantidad de metionina en los medios contiene el *metA* más resistente a la inhibición por retroalimentación.

En la figura 3 se proporciona una representación esquemática de la metodología de examen.

Construcción del mutante por delección de *metB*

Para preparar un mutante por delección de *metB* en TF4076BJF, se usó el método de delección en una etapa FRT (Datsenko y Wanner, PNAS 97:6640-6645, 2000). Se amplificaron fragmentos de PCR usando las secuencias de cebador 15 y 16 (SEQ ID NO: 25 y 26) y se introdujo por electroporación el molde pKD3 en células TF4073BJF. Se usaron las 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, luego 72°C durante 7 min y premezcla de PCR HL (Corea, Bioneer Co). Se seleccionaron colonias resistentes a cloranfenicol y se confirmó la delección del gen *metB* usando PCR. Se eliminó el gen marcador de cloranfenicol usando transformación con el plásmido pCP20, y se confirmó la eliminación mediante PCR. La cepa obtenida mediante este procedimiento se nombró TF4076BJF-B.

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

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

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

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

Construcción del mutante por delección de *metA*

Para preparar un mutante por delección de *metA* en TF4076BJF-B, se usó el método de delección en una etapa FRT (PNAS .97:6640-6645, 2000). Se amplificaron fragmentos de PCR usando las secuencias de cebador 17, 18 (SEQ ID NO: 27 y 28) y se introdujo por electroporación el molde pKD3 en células TF4073BJF-B. Se usaron las 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, luego 72°C durante 7 minutos y premezcla de PCR HL (Corea, Bioneer Co). Se seleccionaron colonias resistentes a cloranfenicol y se confirmó la delección del gen *metA* usando PCR. Se eliminó el gen marcador de cloranfenicol usando transformación con el plásmido pCP20, y se confirmó la eliminación mediante PCR. La cepa obtenida mediante este procedimiento se nombró TF4076BJF-BA.

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

5'-
CAATTTCTTGCGTGAAGAAAACGTCTTTGTGATGACAACTTCTCGT
GCGTgtgtaggctggagctgcttcc -3'

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

5'-

AATCCAGCGTTGGATTTCATGTGCCGTAGATCGTATGGCGTGATCTG

GTAGcatatgaatcctccttag-3'

Construcción del vector de expresión de metA

Para preparar una biblioteca de *metA*, se construyó un vector de expresión de *metA*. Se amplificó el gen *metA* usando las secuencias de cebador 19 y 20 (SEQ ID NO: 29 y 30) con el cromosoma de la cepa de *E. coli* K12 como molde. Se usaron las 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, luego 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 *Sma*I. El plásmido se nombró pA-CL. Se transformó el plásmido pA-CL en la cepa TF4076BJFAB y se realizó el cultivo en frasco con y sin metionina. Se midieron OSHS y homoserina mediante el mismo método que se describió anteriormente para metionina. Tal como se muestra en la tabla 6, las células que contenían el plásmido pA-CL en ausencia de metionina produjeron OSHS 3,8 g/l con homoserina 0,24 g/l. Sin embargo, en presencia de metionina 1 g/l las células produjeron OSHS 5,8 g/l con homoserina 4,9 g/l. El aumento de la cantidad de OSHS se debe al aumento de crecimiento por la adición de metionina, mientras que el aumento de homoserina se debe a la inhibición por retroalimentación de la actividad *metA* por 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	TF4076BJFAB/pC11920	2,2	14,2	0	1,42
0 g/l	TF4076BJF-AB/pACL	2,1	13,1	3,8	0,24
1 g/l	TF4076BJF-AB/pC11920	4,7	39,8	0	5,7
1 g/l	TF4076BJF-AB/pACL	6,4	37,4	5,9	4,9

19: *metA* SEQ ID NO: 29

5'-aatggaatccTGCCGTGAGCGGCGAATAC-3'

20: *metA* SEQ ID NO: 30

5'-agctctagaCTGCTGAGGTACGTTTCGG-3'

Construcción de la biblioteca de mutantes de pA-CL

Para preparar una biblioteca de mutantes de pA-CL, se realizó PCR propensa a errores. Se realizó la PCR propensa a errores usando las secuencias de cebador 21 y 22 (SEQ ID NO: 31 y 32) con el plásmido pA-CL como molde. Se usaron las 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, luego 72°C durante 7 minutos y el kit de mutagénesis por PCR Diversify de BD (BD, EE.UU.). Se digirieron los fragmentos de PCR mediante *Bam*HI y *Xba*I y se ligaron en pCL1920. Se transformó la biblioteca en la cepa TF4076BJF-AB y se recogieron ~30.000 transformantes para su análisis adicional.

21: pCL1920 SEQ ID NO: 31

5'-CGAAGTAATCGCAACATCCG-3'

22: pCL1920 SEQ ID NO: 32

5'-GTCTGCTATGTGGTGCTATC-3'

Preparación del extracto en bruto de enzima MetB

Para medir la OSHS mediante el método enzimático, se usó la enzima MetB de *E. coli*. La enzima MetB reacciona con OSHS y cisteína en una razón 1:1 y produce cistationina. El reactivo DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) Sigma D8130) reacciona con el grupo SH libre de cisteína y produce un color amarillo que puede medirse a 415 nm. Antes de la reacción de MetB, la cisteína reacciona con DTNB y se vuelve de color amarillo. Tras la reacción de MetB, la cisteína se convierte en cistationina que no puede unirse a DTNB. Mediante la disminución de la DO a 415 nm tras la reacción, puede medirse la cantidad de OSHS en la mezcla de reacción.

Para la sobreexpresión de la enzima MetB, se digirió el gen *metB* amplificado por PCR a partir del cromosoma de *E.*

coli K12 mediante *Bam*HI y *Hind*III y se clonó en el vector pCDF-Duet (Novagene, EE.UU.). Se realizó una reacción PCR usando las secuencias de cebador 23 y 24 (SEQ ID NO: 33 y 34) y el cromosoma de *E. coli* K12 como molde. Se usaron las 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, luego 72°C durante 7 minutos y premezcla HL (Bioneer, Corea). Se transformó el plásmido que contenía el gen *metB* en *E. coli* usando una célula Tuner (Novagen, EE.UU.) y se hizo crecer el transformante durante la noche con medios LB que contenían espectinomicina 50 µg/ml. Se diluyó el caldo de cultivo durante la noche en medios LB que contenían espectinomicina 50 µg/ml y se incubó a 37°C hasta que se alcanzó una DO a 600 nm de 0,6, momento en el que se añadió IPTG hasta una final concentración de 0,2 mM y se incubó el cultivo durante 4 h 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 rompieron mediante sonicación (5 x 30 segundos). Se adquirió el extracto celular en bruto mediante centrifugación durante 20 min a 12.000 rpm y entonces se usó el sobrenadante para el ensayo enzimático.

23: *metB* SEQ ID NO: 33

5'-gccaggatccgATGACGCGTAAACAGGCCAC-3'

24: *metB* SEQ ID NO: 34

5'-ccgcaagcttTTTACCCCTTGTTCAGCC-3'

Examen de *metA* resistente a la retroalimentación

Se identificaron mutaciones de *metA* resistentes a la retroalimentación inoculando la cepa TF4076BJF-AB que contenía mutantes de pA-CL en placas de 96 pocillos que contenían medios de microfermentación y cultivando durante 48 h a 31°C con agitación. Los medios de microfermentación son 1 volumen de medios de frasco de agitación tal 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.

Entonces se centrifugaron las placas de 96 pocillos durante 10 min a 3.000 rpm y se midió OSHS en el sobrenadante mediante el método enzimático descrito anteriormente (preparación de extracto en bruto de MetB). Se mezclaron 50 µl del sobrenadante de cultivo con 50 µl de tampón de reacción (tampón de reacción: tampón fosfato de potasio 0,1 M (pH 7,5) + cisteína 2,5 mM + 1/500 PLP 10 mM (piridoxal-5'-fosfato hidratado, Sigma P9255) + 1/100 extracto en bruto de MetB (5 mg/ml)). Se incubó la reacción durante 10 minutos a 37°C. Se añadieron 100 µl de DTNB (4 mg/10 ml de tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,5) y se tomó la DO a 415 nm. Se seleccionaron 1 ó 2 colonias que mostraban la menor absorbancia a 415 nm de cada placa de 96 pocillos y se sembraron en línea sobre medios LB que contenían espectinomicina 50 µg/ml. Se inocularon las colonias resultantes sobre otra placa de 96 pocillos que contenía medios de microfermentación y se realizó una segunda ronda de examen. Entonces se sometieron a prueba las cepas seleccionadas en las condiciones de cultivo en frasco de agitación descritas anteriormente, con la adición de metionina 5 g/l al medio, y se midió la producción de O-succinilhomoserina.

Se seleccionaron 24 mutantes a partir de 12.000 colonias para el cultivo en frasco y se seleccionaron 14 mutantes para la secuenciación. De esos, se identificaron 5 nuevos mutantes. Los otros 9 mutantes restantes presentaban las mismas mutaciones que se habían notificado anteriormente. En la tabla 7 se muestra la acumulación de O-SHS y homoserina en el cultivo de frasco de agitación para los 14 mutantes, y en la tabla 8 se muestran los cambios de aminoácidos en las secuencias de *metA* de los mutantes seleccionados.

[Tabla 7]

Rendimiento en frasco de agitación de mutantes seleccionados

Cepa n.º	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
N.º 7	4,9	40	9,2	2,9
N.º 8	4,6	40	5,4	3,8
N.º 10	4,7	40	8,8	3,0
N.º 11	4,7	40	9,1	2,8
N.º 32	5,8	40	10,7	1,6
N.º 34	5,6	40	10,1	2,4
N.º 36	5,6	40	10,4	2,2
N.º 37	5,9	40	9,6	1,6
N.º 39	7,0	40	9,2	1,0
N.º 22	4,8	40	9,4	1,4
N.º 23	4,6	40	9,6	1,4
N.º 41	5,6	40	11,8	2,1
N.º 43	6,1	40	11,2	2,3

N.º 47	6,0	40	11,2	2,2
N.º 49	5,6	40	11,5	2,1

[Tabla 8]

Análisis de secuencia de mutantes seleccionados

Posición	Silvestre	32 SEQ ID NO: 2	37 SEQ ID NO: 4	10 SEQ ID NO: 6	11 SEQ ID NO: 8	41 SEQ ID NO: 10
24	T		S (A70T)			
29	S				P (T85C)	
79	N					S (A236G)
114	E				G (A341G)	
140	F				S (T419C)	I (T418A)
163	K	Q (A487C)				
222	F	L (T666A)				
275	A		E (C824A)			
290	N			H (A868C)		
291	Y					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

Resistencia a la retroalimentación de metA mutante

- 5 Puesto que todos los *metA* resistentes a la inhibición por retroalimentación producían cantidades similares de OSHS en presencia de metionina 5 g/l en el cultivo en frasco, se añadieron concentraciones de metionina superiores en los medios de cultivo en frasco y se determinó la producción de OSHS. Tras 64 h de cultivo con L-metionina 30 g/l, la producción de OSHS disminuyó sólo en la muestra de mutante n.º 37, y todas las otras mostraron niveles similares de producción de OSHS que en presencia de metionina 5 g/l. Estos resultados, presentados en la tabla 9, indicaron que los *metA* con resistencia a la inhibición por retroalimentación eran resistentes a concentraciones de hasta 10 metionina 30 g/l.

[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
N.º 10	3,3	33,1	10,6	0,44
N.º 11	3,5	36,6	11,5	0,22
N.º 32	3,1	30,2	10,7	0,23
N.º 37	2,0	22,0	6,2	0,05
N.º 41	4,4	40,0	10,5	No analizado

Caracterización in vitro de proteínas de metA mutantes

- 15 Se usó PCR para amplificar y luego clonar los cinco genes mutantes *metA* identificados como pCL-A n.º 10, pCL-A n.º 11, pCL-A n.º 32, pCL-A n.º 37 y pCL-A n.º 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 una etiqueta de His en el extremo C-terminal para la purificación de la enzima. Se sobreexpresaron las enzimas, se purificaron y se midió la actividad en presencia de diferentes niveles de metionina y SAMe, tal como se describe por Lawrence, J. Bacteriol., 109:8-11, 1972. Las únicas modificaciones en el ensayo fueron que se tomaron múltiples puntos y que la reacción se extinguió 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 silvestre y que los mutantes n.º 10 y n.º 11 eran los más resistentes a la inhibición tanto con metionina como con SAM.

[Tabla 10]

- 25 Caracterización de enzimas MetA mutantes y silvestres

Actividad específica (U/mg)*	Silvestre	N.º 10 SEQ ID NO: 6	N.º 11 SEQ ID NO: 8	N.º 32 SEQ ID NO: 2	N.º 37 SEQ ID NO: 4	N.º 41 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	Silvestre	N.º 10	N.º 11	N.º 32	N.º 37	N.º 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 donde U es la formación de 1 μ mol de CoA por minuto a temperatura ambiente

Se seleccionaron los mutantes *metA* n.º 10 y *metA* n.º 11 (SEQ ID NO: 5 y 7, respectivamente) para su análisis adicional. Se analizaron los mutantes de *metA* n.º 10 y n.º 11 para determinar su falta de inhibición en un experimento usando 300 mM de metionina. Ésta está próxima a la concentración más alta que puede lograrse en las condiciones de ensayo. La solubilidad de metionina en agua es de 5,6 g/100 ml a 30°C, que corresponde a una concentración de 375 mM. En presencia de 300 mM de metionina, el mutante *metA* n.º 10 conservaba el 70% de su actividad específica, y el mutante *metA* n.º 11 conservaba el 55% de su actividad específica. Por tanto, los mutantes *metA* n.º 10 y n.º 11 pueden usarse en un microorganismo productor de metionina.

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

Se clonaron individualmente *metA* n.º 10 y *metA* n.º 11 en la cepa productora de metionina TF4076BJF. También se clonó *MetA* n.º 10 junto con *metYX* de *L. meyeri*. Se sometieron a prueba los clones siguiendo el protocolo de fermentación descrito en el ejemplo 3A. Se evaluaron las concentraciones de metionina tras 78 horas de fermentación y los resultados se muestran en la tabla 11. No hubo acumulación de O-succinilhomoserina en ninguna de las fermentaciones. En la figura 4 se muestran los transcurso de tiempo de la producción de metionina.

[Tabla 11]

Acumulación de metionina

Cepa	Título de metionina final (g/l)
TF4076BJF	2,1
TF4076BJF <i>metA</i> n.º 10	6,3
TF4076BJF <i>metA</i> n.º 11	4,5
TF4076BJF <i>metA</i> n.º 10 + <i>metYX</i> (Lm)	6,6

Estos resultados muestran que la expresión de *metA* resistentes a la inhibición por retroalimentación aumentó 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 mostró 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 la producción de metionina adicionalmente, puede usarse una *MetY* resistente a la inhibición por retroalimentación.

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

Tal como se describió anteriormente, la formación de SAME disminuye la concentración de metionina y reduce la actividad de la ruta de biosíntesis de metionina por medio de inhibición por retroalimentación de *metA*.

El aislamiento de mutantes en el 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 provocan una disminución en la actividad *MetK*. Se construyeron esos mutantes tal como se describe a continuación.

Se clonó el gen *metK* de *E. coli* (número de registro AP_003499 o BAE77005) y se sobreexpresó con una etiqueta de His o bien N-terminal o bien C-terminal en el vector pET28b. Se realizó mutagénesis dirigida al sitio usando el clon de *metK* con etiqueta de His C-terminal para generar los mutantes deseados. Se confirmó la expresión de las proteínas *MetK* mutantes.

Se purificaron los mutantes de *MetK* (usando la etiqueta de His C-terminal) y se sometieron a ensayo *in vitro*. Se usó la proteína *MetK* con etiqueta de His C-terminal silvestre como control. Se sometieron a ensayo los mutantes usando

un ensayo radiactivo. Las condiciones de ensayo fueron las siguientes:

Mezcla de ensayo:

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

0,5 ml de KCl 1,0 M

5 0,2 ml de MgCl₂ 1,0 M

1,0 ml de ATP 100 mM (sal de disodio, 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

10 EDTA 25 mM pH 8,0 para detener los ensayos.

Se añadieron 45 µl de mezcla de ensayo a un tubo Eppendorf y 5 µl de enzima (datos normalizados mostrados en la tabla 13). Se incubó la reacción a temperatura ambiente (o 25°C) durante un periodo deseado (de 1 a 10 minutos). Se detuvo la reacción con la adición de 150 µl de EDTA 25 mM. Se colocaron 100 µl de la reacción sobre un círculo de filtro de fosfocelulosa Whatman P-81 de 2,5 cm de diámetro (marcado con un lápiz). Se lavaron los filtros con 3 l de agua destilada, se secaron al aire y se colocaron en viales de centelleo con Aquasol. Se contaron las emisiones usando una ventana que se extiende desde ¹⁴C hasta aproximadamente 0. Se determinaron la eficacia del ensayo y los niveles de extinción añadiendo una cantidad conocida de cuantas de ¹⁴C-SAM pura y procesando a lo largo de todo el procedimiento. El fondo era normalmente < 100 cpm (cuentas totales de aprox. 10⁵ cpm por reacción).

[Tabla 12]

20 Actividad normalizada

Residuo	Posición	Reemplazo	Efecto esperado sobre la síntesis de SAME	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 de ~103 veces	J. Biol Chem 1999	2,5
Gly	77	Val	Disminución esperada en la actividad MetK	Comunicación personal de Markham	6,9
Cys	90	Ala	Sólo el 10% de la actividad silvestre	J. Biol Chem 1995	Igual que la silvestre
Cys	90	Ser	Sólo el 10% de la actividad silvestre	J. Biol Chem 1995	23,2
Asp	118	Asn	Reducción de kcat de ~103 veces	J. Biol Chem 1999	1,3
Val	185	Glu	Aumento de 6,4X en Met excretada con respecto al control	AEM 2005	4,9
Asp	238	Asn	Reducción de kcat de ~103 veces	J. Biol Chem 1999	1,9
Cys	239/240	Ala*	Sólo el 10% de la actividad silvestre	J. Biol Chem 1995	Igual que la silvestre
Lys	245	Met	Actividad 42.000 veces menor que la enzima silvestre	J. Biol Chem 2000	2,5
Asp	271	Ala	Reducción de kcat de ~103 veces	J. Biol Chem 1999	0,4 (no duplicado)
Control silvestre*		Ninguno		Cargill BioTDC	995,4
Silvestre	Sin etiqueta	Ninguno		Laboratorio Markham	5600

* La proteína MetK control silvestre también estaba etiquetada con His C-terminal para la comparación con las proteínas de *metK* mutantes etiquetadas. Se observó una disminución de aproximadamente 6 veces en la actividad con la proteína MetK silvestre etiquetada en comparación con la actividad de la proteína MetK no etiquetada.

** Actividad durante un tiempo de reacción de 5 minutos notificada

- 5 El producto de la reacción de MetK, SAME, es un inhibidor no competitivo de MetK. Por tanto, la cinética de reacción es complicada de analizar y se espera que la diferencia entre las actividades de la enzima silvestre y los mutantes sea incluso superior. Entendiendo la actividad de las diversas enzimas MetK mutantes, puede diseñarse un huésped de producción adecuado.

D. Regulación del transportador de SAME

- 10 S-AdenosilMet (SAME) sirve como donador de grupos metilo principal en todos los organismos, está implicado en la biosíntesis de poliamina y es esencial para el crecimiento celular. S-adenosiltransferasa (MetK, EC 2.5.1.6) cataliza la única ruta conocida para la biosíntesis de SAME en *E. coli*, ya que este organismo no puede captar SAME del medio de crecimiento. Una alternativa para la regulación por disminución de *metK* tal como se describió anteriormente es dotar a *E. coli* de la capacidad de captar SAME y simultáneamente desactivar el gen *metK*, para
15 reducir o evitar el uso de metionina por medio de esa ruta. Entonces puede controlarse el crecimiento celular 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 μ M que son comparables a los valores para el transportador de *S. cerevisiae* (3,3 μ M), *P. carinii* (4,5 μ M) e hígado de rata (8,9 μ M). Además, se ha notificado que el
20 sistema de transporte de SAME de *Rickettsia* puede complementar un mutante por delección de *metK* de *E. coli* (Driskell *et al.*, J. Bact. 187:5719-5722, 2005).

- Se transformaron las cepas W3110 y TF4076BJF con un plásmido que contenía el transportador de SAM mencionado anteriormente. Se desactivó el gen *metK* de W3110 y se verificó mediante PCR. Según estas modificaciones, la nueva cepa debe poder crecer sólo en presencia de SAM, pero no sin ella. Sin embargo, siguió
25 creciendo tanto en ausencia como en presencia de SAM exógena.

E. Desactivación de 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 ($K_m = 0,1-0,13 \mu$ M) y un segundo con menor afinidad ($K_m = 20-40 \mu$ M). El locus para el sistema de transportador de alta afinidad se
30 designa *metD* puesto que los mutantes de *metD* no pueden transportar D-metionina y usarla como fuente de metionina. El locus *metD* corresponde a los genes *abc* (*metN*), *yaeE* (*metI*) y *yaeC* (*metQ*) que codifican un transportador ABC necesario para la captación de L-metionina y D-metionina. *metN* codifica la ATPasa supuesta y *metI* codifica la región que se extiende por la membrana del transportador ABC *metD*. Se espera que el tercer componente, *metQ*, codifique para el dominio de unión a sustrato. Puesto que los mutantes por delección de *metI*,
35 *metN* y *metQ* todavía pueden crecer en presencia de L-metionina, se toma como una evidencia indirecta de la presencia del sistema de *metP* de baja afinidad.

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

- Se mostró que *metJ*, la proteína represora de metionina global, controlaba 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 una delección de *metJ*, los transportadores se expresan más altamente y no se reprimen por metionina (Merlin *et al.*, J. Bacteriol. 184: 5513-5517, 2002). Las cepas de producción de metionina
45 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 desactivando el sistema de captación de metionina de *metD*. Esto impedirá la captación de metionina y evitará el posible ciclo inútil de desperdicio de energía de captación/excreción.

- La desactivación de *metD* dio como resultado un aumento del 25% en la acumulación de metionina en el caldo de fermentación, tal como se mide mediante el protocolo de frasco de agitación descrito en el ejemplo 3, anteriormente.

F. Sobreexpresión de *metH*

- El aumento en el flujo de carbono a través de la ruta de metionina debido a las modificaciones en las cepas descritas en el presente documento, 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
55 importante tener una actividad homocisteína metilasa (EC 2.1.1.13 y 2.1.1.14) muy activa que se codifican por *metE*

y *metH*, respectivamente. Un modo de lograr esto es sobreexpresar estos genes o bien en un sistema de plásmido o bien colocando la copia cromosómica bajo el control de un promotor fuerte.

Se sobreexpresó el gen *metH* nativo de *E. coli* bajo varios promotores diferentes en una cepa que contenía las rutas dobles *metABC* y *metXY*, y se midió la producción de metionina en el protocolo de frasco de agitación convencional. Los tres vectores usados para la sobreexpresión de *metH* fueron pCL-P(*cysK*), pCL-P(*pro*) y pCL-P(CJ-1) que se modificaron respectivamente a partir del plásmido disponible comercialmente 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 situó el ORF del gen *metH* de *E. coli* justo en el sentido de 3' de los promotores. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13, a continuación. Quedó claro que incluso a los niveles relativamente bajos de metionina acumulada en el protocolo de frasco de agitación, la presencia de una alta concentración de la homocisteína metilasa tuvo un efecto positivo muy significativo sobre la producción de metionina. El efecto fue incluso más pronunciado en fermentadores.

[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> YX Lm	7,4	40,0	868
TF4076BJF <i>met</i> YX Lm pCL-P(<i>cysK</i>) <i>met H</i>	11,7	33,9	1289
TF4076BJF <i>met</i> YX Lm pCL-P (<i>pro</i>) <i>met H</i>	7,5	32,8	1062
TF4076BJF <i>met</i> YX Lm pCL-P (CJ-1) <i>met H</i>	12,4	40,0	1337
TF4076BJF <i>met</i> YX Dr	10	38,2	569
TF4076BJF <i>met</i> YX Dr pCL-P (<i>cysK</i>) <i>met H</i>	15,4	40,0	896
TF4076BJF <i>met</i> YX Dr pCL-P (<i>pro</i>) <i>met H</i>	12,5	40,0	786
TF4076BJF <i>met</i> YX Dr pCL-P (CJ-1) <i>met H</i>	15	40,0	856

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

Este ejemplo describe un método de modificación por ingeniería genética de *E. coli* para sortear el producto intermedio, PAPS, en su ruta de asimilación de azufre endógena. La nueva ruta creada requiere una molécula de ATP menos por cada molécula de sulfato reducida a sulfuro, por tanto, es más eficiente desde el punto de vista energético (véase la figura 6).

Tal como se describió anteriormente, la figura 6 muestra dos modos para aprovechar rutas de asimilación de azufre alternativas. Un modo es clonar el gen de adenililsulfato reductasa, *cysH* (EC 1.8.4.9) de *Bacillus* o *P. aeruginosa* y o bien incorporarlo en el genoma de *E. coli* o bien expresarlo a partir de un plásmido. Esto permite que APS se convierta en sulfito en una única etapa, evitando así la conversión de APS en PAPS catalizada por APS cinasa (*cysC*) de *E. coli*. El segundo modo sería mutar el gen de PAPS reductasa de *E. coli*, basándose en los homólogos de *cysH* bacterianos, de modo que su especificidad de sustrato se cambia de PAPS a APS.

Se clonaron los genes *cysH* de *Bacillus subtilis* 168 (número de registro AJ000974 región: 548..1249) y *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (número de registro NC_002516 región: 1895692..1896495) en plásmidos y se sometieron a prueba para determinar si podían complementar mutantes deficientes en *cysC* o *cysH* de *E. coli*, que son auxótrofos tanto para cisteína como para metionina.

En resumen, se transformaron los genes *cysH* de *Bacillus subtilis* 168 y *Pseudomonas aeruginosa* PA01 en BL21(DE3) Δ *cysH*, un mutante deficiente en *cysH* de BL21(DE3), para someter a prueba la complementación. Se usaron colonias individuales a partir de las cuatro cepas siguientes para inocular cultivos de 5 ml que contenían el medio Overnight Express (OnEX: medio definido complementado con aminoácidos pero sin cisteína ni metionina) de Novagen.

Se incubaron los cultivos durante 48 h 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* podían 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 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> + pET23PacysH (adición de <i>cysH</i> de <i>Pseudomonas</i>)	6,8
--	-----

De manera similar, se usó una cepa que tenía el gen *cysC* desactivado para someter a prueba la complementación mediante 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 mediante DO_{600 nm}. Los resultados, mostrados en la tabla 15, indicaron que APS reductasa codificada por *cysH* tanto de *B. subtilis* como de *P. aeruginosa* podía complementar la mutación de *cysC* en BL21(DE3), lo que demostró 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 el promedio de tres cultivos.

Sobreexpresión de enzimas en la ruta de asimilación de azufre

Tal como se describió anteriormente, para aumentar la producción de metionina puede ser útil tener una ruta de asimilación de azufre muy eficaz. Para facilitar la sulfhidrilación directa del precursor de acilhomoserina, la disponibilidad de SH₂ es esencial. 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 fueron:

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 *CysJ/CysG*: NADPH-sulfito reductasa (EC 1.8.1.2)

CysB: activador de la transcripción

Se sobreexpresaron estos genes en una cepa que contenía las rutas dobles *metABC* y *metXY*, y se midió la producción de metionina en el protocolo de frasco de agitación convencional. Se clonaron respectivamente los cinco grupos mencionados anteriormente de genes de asimilación de sulfato en el vector pCL-(Prmf) que se construyó reemplazando el promotor Plac del plásmido pCL1920 por el promotor del gen *rmf* de *E. coli*. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16 a continuación:

[Tabla 16]

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

Cepas	DO	Met mg/l	Met/DO
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm)	8,0	934	116
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm) <i>cysPUWA</i>	4,2	206	49
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm) <i>cysDN</i>	10,3	1271	123
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm) <i>cysCcysH</i>	9,9	1348	136
TF4076BJF <i>metYX</i> (Lm) <i>cysJ/cysG</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 el regulador de la transcripción dio como resultado una producción de metionina inferior y una disminución significativa en la cantidad de metionina por unidad de masa celular. El aumento de la actividad de la sulfurilasa, la APS cinasa y la sulfotransferasa, dio todo como resultado un aumento de la producción de metionina por unidad de células así como la metionina total producida. Dado que estos aumentos se observan en una cepa que alberga dos plásmidos diferentes, puede esperarse que los resultados mejorarán mucho más una vez que se ajuste y se optimice la expresión de las enzimas.

35 Ejemplo 4: Producción a modo de ejemplo de cepas de metionina

Tal como se describió anteriormente, las diversas modificaciones genéticas descritas en el presente documento

pueden realizarse a través de la incorporación de secuencias de ADN recombinante independientes del cromosoma, o las secuencias de ADN recombinante pueden incorporarse en el cromosoma de la cepa de producción. Las secuencias de ADN recombinante pueden incorporarse en las células huésped como una única copia o en múltiples copias.

- 5 i) Un microorganismo, tal como *E. coli* ATCC n.º 13070 o TF4076, se modifica por ingeniería genética para contener una delección funcional de *thrB* y *metJ* de modo que se atenúan los genes. Este microorganismo expresa los genes *metX* y *metY*, así como una secuencia de ácido nucleico recombinante que provoca 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 provoca un aumento del flujo de homocisteína a metionina.
 - 10 ii) Se crea otra cepa de producción realizando las siguientes modificaciones en el microorganismo descrito en i). El microorganismo descrito en i) se modifica adicionalmente transformando el microorganismo con una molécula de ADN recombinante que codifica un gen *metZ* activo, tal como el de *Pseudomonas aeruginosa*.
 - iii) Se crea aún otra cepa de producción realizando las siguientes modificaciones en el microorganismo descrito en i). El microorganismo descrito en i) se modifica adicionalmente para reemplazar el gen *metA* nativo por un gen *metA* resistente a la inhibición por retroalimentación, tal como los descritos en el ejemplo 3.
 - 15 iv) Se crea otra cepa de producción realizando las modificaciones adicionales en el microorganismo descrito en iii). El microorganismo descrito en iii) se transforma con un gen *metZ* activo.
 - v) Se crea otra cepa de producción realizando las siguientes modificaciones en el microorganismo descrito en i). El microorganismo descrito en i) que sobreexpresa el producto del gen *metF* se modifica adicionalmente para atenuar el gen represor transcripcional *lacI*.
 - 20 vi) Se crean cepas de producción adicionales realizando las siguientes modificaciones en cualquiera de las cepas de producciones descritas en el presente documento. Las cepas de producción se modifican por ingeniería genética para sobreexpresar los genes *cysDN*, *cysIJ* o *cysCH* o combinaciones de los mismos para mejorar la asimilación de azufre. Opcionalmente, estas cepas de producción se modifican adicionalmente para reemplazar los genes *cysC* y *cysH* nativos de *E. coli* por un único gen *cysH* de *P. aeruginosa* o *B. subtilis*.
 - 25 vii) Se prepara otra cepa de producción modificando cualquiera de las cepas de producción descritas en el presente documento de manera que se atenúa el gen importador de metionina *metD*.
- Se exponen aspectos y características de la presente divulgación en las siguientes disposiciones numeradas que contienen la materia de las disposiciones de la solicitud original tal como se presentó.
- 30 1. Microorganismo que comprende:
uno o más primeros péptidos que comprenden actividad de sulfhidrilación directa (EC 2.5.1.49 y 4.2.99.-), en el que la actividad de sulfhidrilación directa usa como sustrato OSHS u OAHS; y
uno o más segundo péptidos que comprenden actividad de trans-sulfuración (EC 2.5.1.48 y 4.4.1.8), en el que la actividad de sulfhidrilación directa consiste en la expresión a partir de una secuencia de ácido nucleico exógena.
 - 35 2. Microorganismo según la disposición 1, en el que el microorganismo es *E. coli*.
 3. Microorganismo según la disposición 1, que comprende además una cantidad detectable de metionina.
 4. Microorganismo según la disposición 1, que comprende además una cantidad detectable de SAME.
 5. Microorganismo según la disposición 3, en el que al menos el 10% de la metionina producida es a partir de la actividad de trans-sulfuración.
 - 40 6. Microorganismo según la disposición 4, en el que al menos el 10% de la SAME producida es a partir de la actividad de trans-sulfuración.
 7. Microorganismo según la disposición 3, en el que al menos el 10% de la metionina producida es a partir de la actividad de sulfhidrilación directa.
 8. Microorganismo según la disposición 4, en el que al menos el 10% de la SAME producida es a partir de la actividad de sulfhidrilación directa.
 - 45 9. Microorganismo según la disposición 1, que comprende además un péptido de homoserina O-succiniltransferasa que es resistencia a la retroalimentación.
 10. Microorganismo según la disposición 1, que comprende además un péptido de homoserina O-succiniltransferasa con n.º de registro de GenBank: AAC76983 que tiene mutaciones en la posición de aminoácido 24, 29, 79, 114, 140, 163, 222, 275, 290, 291, 295, 297, 304, 305, o combinaciones de las mismas.
 - 50

11. Microorganismo según la disposición 1, que comprende además un péptido de homoserina O-succiniltransferasa que comprende SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10.
12. Microorganismo según la disposición 1, que comprende además una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica una adenililsulfato reductasa (EC 1.8.99.2).
- 5 13. Microorganismo según la disposición 1, en el que se atenúa al menos un gen seleccionado de *metD*, *metK*, *metJ*, *thrB*, *serA* o combinaciones de los mismos.
14. Microorganismo según la disposición 1, en el que se sobreexpresa al menos un gen seleccionado de *metA*, *metB*, *metC*, *metE*, *metY*, *metZ*, *metX*, *methH*, *cysPWUA*, *cysD*, *cysN*, *cysC*, *cysH*, *cysI*, *cysJ*, *cysG*, *csyK*, *cysM*, y combinaciones de los mismos.
- 10 15. Método de preparación de metionina que comprende:
cultivar el microorganismo según la disposición 1 en condiciones que permiten la producción de metionina; y
aislar la metionina.
16. Método según la disposición 15, en el que el primer péptido que tiene actividad de sulfhidrilación directa está codificado por *metZ*, *metY* o combinaciones de los mismos.
- 15 17. Método según la disposición 15, en el que el microorganismo es *E. coli*.
18. Método según la disposición 16, en el que al menos el 10% de la metionina se produce a partir del primer péptido y en el que el primer péptido está codificado por *metZ*, *metY* o combinaciones de los mismos.
19. Método según la disposición 15, en el que al menos el 10% de la metionina se produce a partir del segundo péptido y en el que el segundo péptido está codificado por *metB*, *metC* o combinaciones de los mismos.
- 20 20. Método según la disposición 15, en el que la actividad de trans-sulfuración endógena está codificada por *metB*, *metC* o combinaciones de los mismos.
21. Método según la disposición 1, en el que al menos el 10% de la metionina producida se produce a partir del primer péptido y en el que el primer péptido está codificado por un gen *metZ*.
- 25 22. Microorganismo según la disposición 1, en el que el primer péptido es un péptido de MetX que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con los números de registro CAA71733, ZP_00766367 o ZP_00107218.
23. Microorganismo según la disposición 1, en el que el primer péptido es un péptido de MetX que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con los números de registro CAA71733, ZP_00766367 o ZP_00107218.
- 30 24. Método según la disposición 15, en el que el primer péptido es un péptido de MetY que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con los números de registro AAG08410, CAA71732, ZP_00766366 o ZP_00107219.
25. Método según la disposición 15, en el que el primer péptido es un péptido de MetY que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con los números de registro AAG08410, CAA71732, ZP_00766366 o ZP_00107219.
- 35 26. Método según la disposición 15, en el que el segundo péptido es un péptido de MetZ que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencia de al menos el 70% con el número de registro AAG06495.
27. Método según la disposición 15, en el que el segundo péptido es un péptido de MetZ que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencia de al menos el 90% con el número de registro AAG06495.
- 40 28. Método según la disposición 15, en el que el microorganismo comprende además un gen atenuado seleccionado de *metD*, *metK*, *metJ*, *thrB*, *serA* o combinaciones de los mismos.
29. Método según la disposición 15, en el que el microorganismo comprende además cambios adicionales en la secuencia de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que dan como resultado una cepa de producción modificada por ingeniería genética, y en el que la cepa de producción modificada por ingeniería genética produce el 10% más de metionina en comparación con el microorganismo sin tales cambios.
- 45 30. Método según la disposición 29, en el que la cepa de producción modificada por ingeniería genética incluye una modificación genética para disminuir el catabolismo de productos, aumentar la disponibilidad de reactantes, disminuir la inhibición de la ruta de biosíntesis de metionina o combinaciones de los mismos.

31. *E. coli* aislada que comprende una cistationina gamma sintasa (EC 2.5.1.48) u O-succinilhomoserina sulfhidrolasa (EC 4.2.99.-) y una homocisteína sintasa (EC 2.5.1.49) expresadas a partir de una secuencia de ácido nucleico exógena.
- 5 32. *E. coli* aislada según la disposición 31, que comprende una cistationina gamma sintasa (EC 2.5.1.48) expresada a partir de una secuencia de ácido nucleico endógena y una homocisteína sintasa (EC 2.5.1.49) expresada a partir de una secuencia de ácido nucleico exógena.
33. *E. coli* aislada según la disposición 32, que comprende además homoserina O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31).
34. *E. coli* aislada según la disposición 31, en la que la secuencia de ácido nucleico exógena comparte una identidad de secuencia de al menos el 70% con un número de registro seleccionado de los números de registro AE004091, AE004091 región: 5655648..5656925, Y10744 región: 1485..2813, NZ_AAAH02000004 región: 164536..165990 y NZ_AAAY02000081 región: complemento (12750..14054).
- 10 35. *E. coli* aislada según la disposición 31, en la que la secuencia de ácido nucleico exógena comparte una identidad de secuencia de al menos el 90% con un número de registro seleccionado de los números de registro AE004091, AE004091 región: 5655648..5656925, Y10744 región: 1485..2813, NZ_AAAH02000004 región: 164536..165990 y NZ_AAAY02000081 región: complemento (12750..14054).
- 15 36. *E. coli* aislada según la disposición 31, en la que la secuencia de ácido nucleico exógena se selecciona de los números de registro AE004091, AE004091 región: 5655648..5656925, Y10744 región: 1485..2813, NZ_AAAH02000004 región: 164536..165990 y NZ_AAAY02000081 región: complemento (12750..14054).
- 20 37. *E. coli* aislada según la disposición 31, que comprende además una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica una adenilil sulfato reductasa (EC 1.8.99.2).
38. Método de preparación de metionina, que comprende
- cultivar un microorganismo aislado que comprende una molécula de ADN recombinante, en el que la molécula de ADN recombinante sobreexpresa adenilil sulfato reductasa (EC 1.8.99.2) en condiciones suficientes para producir metionina; y
- 25 aislar metionina.
39. Método según la disposición 38, en el que el microorganismo es *E. coli*.
40. Método según la disposición 38, en el que el microorganismo comprende un gen que codifica *metX*, *metY*, *metB*, *metC*, *metZ*, y combinaciones de los mismos.
41. Método según la disposición 40, en el que el gen es endógeno.
- 30 42. Método según la disposición 40, en el que el gen es exógeno.
43. Péptido aislado que comprende un péptido codificado por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 ó 9, en el que el péptido comprende actividad homoserina O-succiniltransferasa.

Lista de secuencias

- 35 <110> Cargill, Incorporated
CJ Corporation
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE METIONINA
- 40 <130> P48357EP2/TCL
- <150> Documento EP07775377.0
- <151> 11-04-2007
- 45 <160> 34
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 930
- <212> ADN
- 50 <213> *Escherichia coli*
- <400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 309

5 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 2

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg

ES 2 575 082 T3

1	5	10	15
Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu	20	25	30
Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile	35	40	45
Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln	50	55	60
Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr	65	70	75
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
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
Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp	245	250	255

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

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

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

Asn Pro Thr Leu Asp
305

<210> 3

<211> 930

5 <212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 3

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

10

<210> 4

<211> 309

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

15

<400> 4

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg

1	5	10	15
Glu Glu Asn Val Phe Val Met Ser Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu	20	25	30
Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile	35	40	45
Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln	50	55	60
Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr	65	70	75
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
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
Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp	245	250	255

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

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

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

Tyr Pro Thr Leu Asp
305

<210> 5

<211> 930

5 <212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 5

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgata      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgctcct gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcctcgatt cccgtgaatc gcgcaacacg      240
cccgagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgctgcttac      360
tgggccgcaga 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 atatgatgog      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac      840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctccac tattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa                                     930

```

10

<210> 6

<211> 309

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

15

<400> 6

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg

ES 2 575 082 T3

1	5	10	15
Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu	20	25	30
Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile	35	40	45
Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln	50	55	60
Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr	65	70	75
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
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
Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp	245	250	255

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

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

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

Asn Pro Thr Leu Asp
305

<210> 7

<211> 930

5 <212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 7

```
atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgtaga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgcctggg caggaaattc gtccacttaa ggttctgata      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgccg gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgcatt cccgtgaatc gcgcaacacg      240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacgggtttga ttgtaactgg tgcgcgcgtg ggcctgggtg ggtttaatga tgcgcgttac      360
tgcccgacga tcaaacaggt gctggagtg tgcgaagatc acgtcacctc gacgctgtct      420
gtctgctggg cggtagaggg cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggccttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgccg gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac      840
ggtaattttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcaca tgaaccacaac gctggattaa      930
```

10

<210> 8

<211> 309

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

15

<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
	20		
Phe	Val	Met	Thr
		25	
Thr	Thr	Ser	Arg
Ala	Pro	Gly	Gln
		30	
Glu			
Ile	Arg	Pro	Leu
	35		
Lys	Val	Leu	Ile
		40	
Leu	Leu	Asn	Leu
Met	Pro	Lys	Lys
	45		
Ile			
Glu	Thr	Glu	Asn
	50		
Gln	Phe	Leu	Arg
		55	
Leu	Leu	Ser	Asn
			60
Ser	Pro	Leu	Gln
Val	Asp	Ile	Gln
Leu	Leu	Arg	Ile
	70		
Asp	Ser	Arg	Glu
		75	
Ser	Arg	Asn	Thr
			80
Pro	Ala	Glu	His
Leu	Asn	Asn	Phe
	85		
Tyr	Cys	Asn	Phe
	90		
Glu	Asp	Ile	Gln
		95	
Asp	Gln	Asn	Phe
	100		
Asp	Gly	Leu	Ile
Val	Thr	Gly	Ala
	105		
Pro	Leu	Gly	Leu
		110	
Val	Gly	Phe	Asn
	115		
Asp	Val	Ala	Tyr
Trp	Pro	Gln	Ile
Lys	Gln	Val	Leu
	125		
Glu	Trp	Ser	Lys
	130		
Asp	His	Val	Thr
		135	
Ser	Thr	Leu	Ser
Val	Cys	Trp	Ala
Val	Gln	Ala	Ala
Leu	Asn	Ile	Leu
	150		
Tyr	Gly	Ile	Pro
		155	
Lys	Gln	Thr	Arg
			160
Thr	Glu	Lys	Leu
Ser	Gly	Val	Tyr
	165		
Glu	His	His	Ile
Leu	His	Pro	His
		175	
Ala	Leu	Leu	Thr
Arg	Gly	Phe	Asp
	180		
Asp	Ser	Phe	Leu
Ala	Pro	His	Ser
	190		
Arg	Tyr	Ala	Asp
	195		
Phe	Pro	Ala	Ala
Leu	Ile	Arg	Asp
Tyr	Thr	Asp	Leu
		205	
Glu	Ile	Leu	Ala
	210		
Glu	Thr	Glu	Glu
		215	
Gly	Asp	Ala	Tyr
Leu	Phe	Ala	Ser
Lys	Asp	Lys	Arg
Ile	Ala	Phe	Val
	230		
Thr	Gly	His	Pro
		235	
Glu	Tyr	Asp	Ala
Gln	Thr	Leu	Ala
Gln	Glu	Phe	Phe
	245		
Arg	Asp	Val	Glu
Ala	Gly	Leu	Asp
		255	

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

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

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

Asn Pro Thr Leu Asp
305

<210> 9

<211> 930

5 <212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 9

```
atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgtaga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggg caggaaattc gtccacttaa ggttctgatac      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgcct gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgcatt cccgtgaatc gcgcagcacg      240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacgggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctgggtg agtttaatatg tgcgcttac      360
tgcccgacaga tcaaacaggt gctggagtg tgcgaaagatc acgtcacctc gacgctgatt      420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggccttg atgattcatt cctggcaccg cactcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgccg gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac      840
ggtaattttac tggtttaccaa ctggctcaac aattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcact tgaatccaac gctggattaa      930
```

10

<210> 10

<211> 309

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

15

<400> 10

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg

ES 2 575 082 T3

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
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
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
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
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR
<400> 11

gctagccatg gttaaagttt atgccccg

28

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

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

gagctcttag ttctcagta ctctgtcgc

29

<210> 13
<211> 71
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 13

atggctgaat ggagcggcga atatatcagc ccatacgtg agcacggcaa ggtgtaggct

60

ggagctgctt c

71

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

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 14

	gtattcccac gtctccgggt taatcccat ctcacgcatg atctccatat gaatatactc	60
	cttag	65
5	<210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR <400> 15	
	gggcttgtc ggtgaaatg	19
15	<210> 16 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR <400> 16	
25	actttgcgat gagcgagag	19
30	<210> 17 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador de PCR	
35	<400> 17	
	gctagccatg agctttttc acgccag	27
40	<210> 18 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador de PCR <400> 18	
50	gagctcttat aaaccaggtc gaaccc	26
55	<210> 19 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador de PCR	
60	<400> 19 cagctgatga gctttttca cgccag	26
	<210> 20	

	<211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> Cebador de PCR <400> 20	
10	aagcttttat aaaccaggtc gaaccc	26
	<210> 21 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador de PCR	
20	<400> 21 cggggtacca ccgcgggctt attcattac at	32
25	<210> 22 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador de PCR <400> 22	
35	acgcgatatc ttaatctcct agattgggtt tc	32
	<210> 23 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador de PCR <400> 23	
45	cggggtacct ggttacaaca acgcctgg	28
	<210> 24 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador de PCR	
55	<400> 24 catgatatct acctcggtac ctttggtcg	29
60	<210> 25 <211> 70 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Cebador de PCR	

	<400> 25		
	ttactctggt gcctgacatt tcaccgacaa agcccaggga acttcatcac gtgtaggctg	60	
	gagctgcttc	70	
5	<210> 26 <211> 69 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> Cebador de PCR		
	<400> 26		
	ttaccccttg tttgcagccc ggaagccatt ttccaggctg gcaattaaat catatgaata	60	
15	tcctcctta	69	
	<210> 27 <211> 71 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> Cebador de PCR		
	<400> 27		
	caatttcttg cgtgaagaaa acgtctttgt gatgacaact tctcgtgcgt gtgtaggctg	60	
25	gagctgcttc c	71	
	<210> 28 <211> 70 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> Cebador de PCR		
35	<400> 28		
	aatccagcgt tggattcatg tgccgtagat cgtatggcgt gatctggtag catatgaata	60	
	tcctccttag	70	
40	<210> 29 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> Cebador de PCR		
45	<400> 29		
	aatggatcct gccgtgagcg gcgaatac	28	
50	<210> 30 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial		
55	<220> <223> Cebador de PCR		

	<400> 30	
	agctctagac tgctgaggta cgtttcgg	28
5	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR <400> 31	
15	cgaagtaatc gcaacatccg	20
	<210> 32 <211> 20 <212> ADN	
20	<213> Artificial <220> <223> Cebador de PCR	
25	<400> 32 gtctgctatg tgggtctatc	20
	<210> 33 <211> 31 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador de PCR <400> 33	
35	gccaggatcc gatgacgcgt aaacaggcca c	31
40	<210> 34 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador de PCR <400> 34	
50	ccgcaagctt ttaccctt gttgcagcc	30

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad homoserina O-succiniltransferasa, que muestra una sensibilidad reducida a la inhibición por retroalimentación por L-metionina en comparación con un polipéptido de homoserina O-succiniltransferasa silvestre derivado de *E. coli*, y que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
2. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica el péptido aislado según la reivindicación 1.
3. Molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 2, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.
4. Plásmido que comprende la molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 2.
5. Cepa de microorganismo transformada con el plásmido según la reivindicación 4.
6. Método de producción de L-metionina que comprende:
cultivar el microorganismo según la reivindicación 5 en condiciones que permiten la producción de L-metionina; y
aislar la L-metionina así producida.

FIG. 1

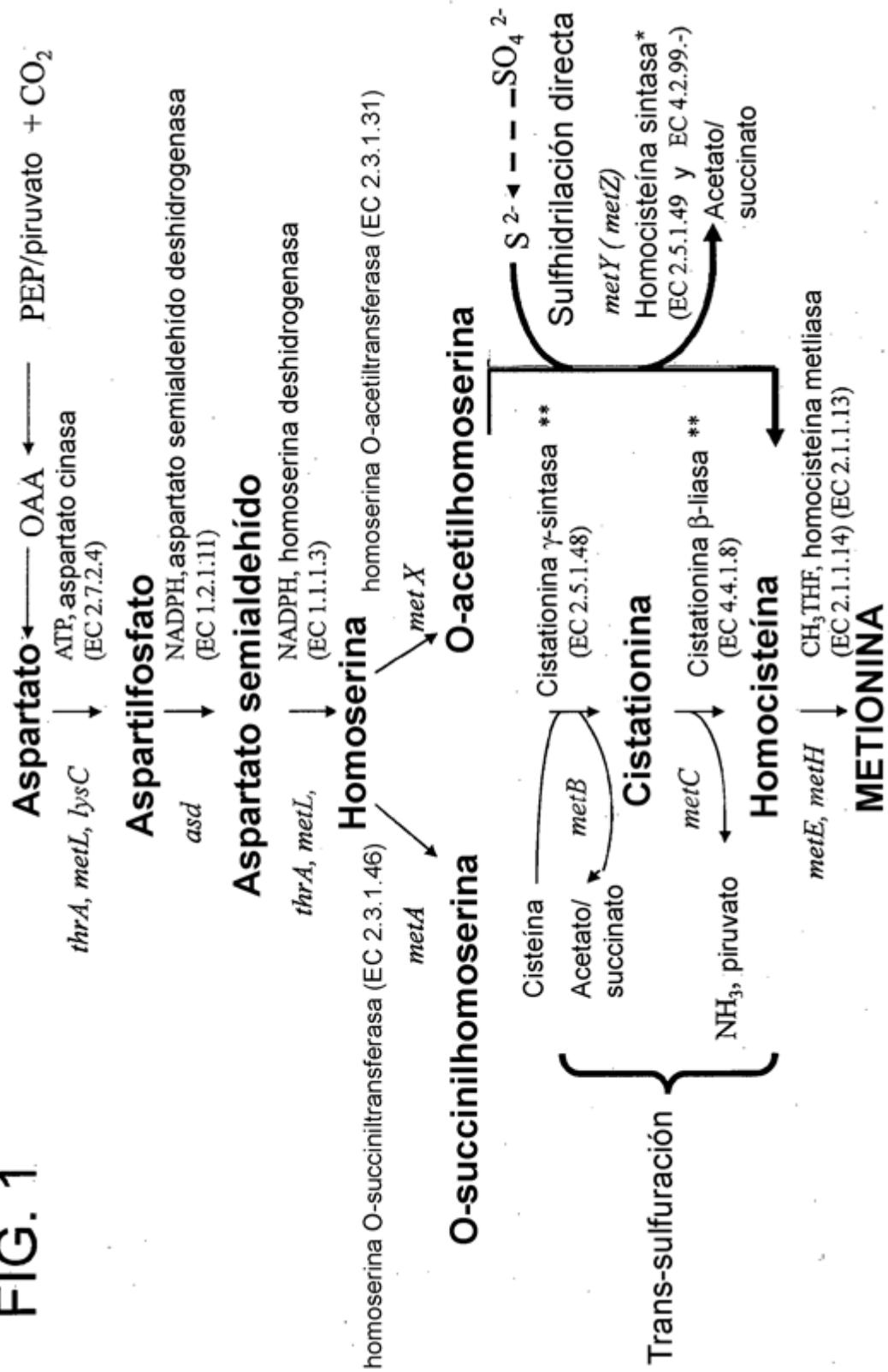
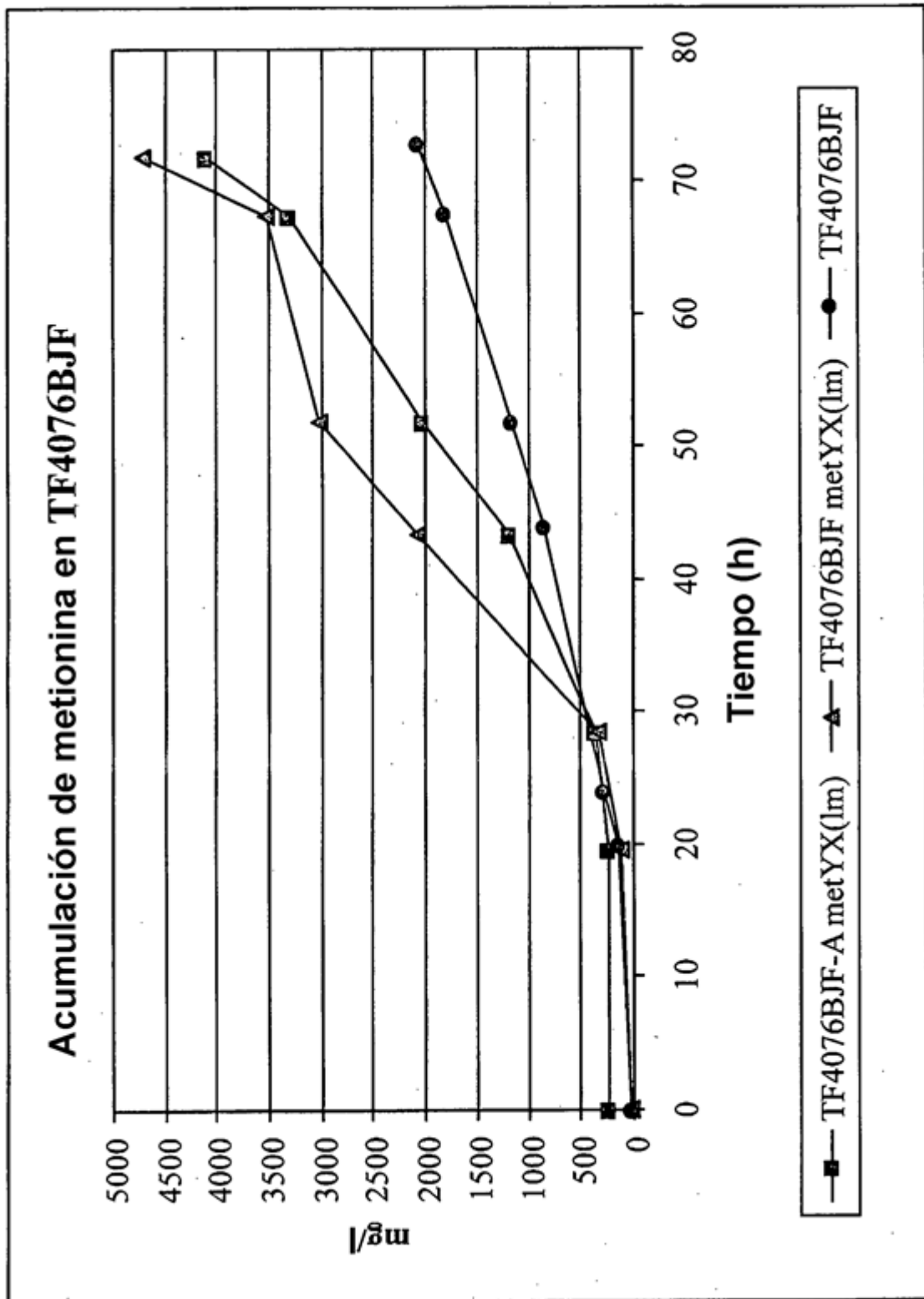


FIG. 2



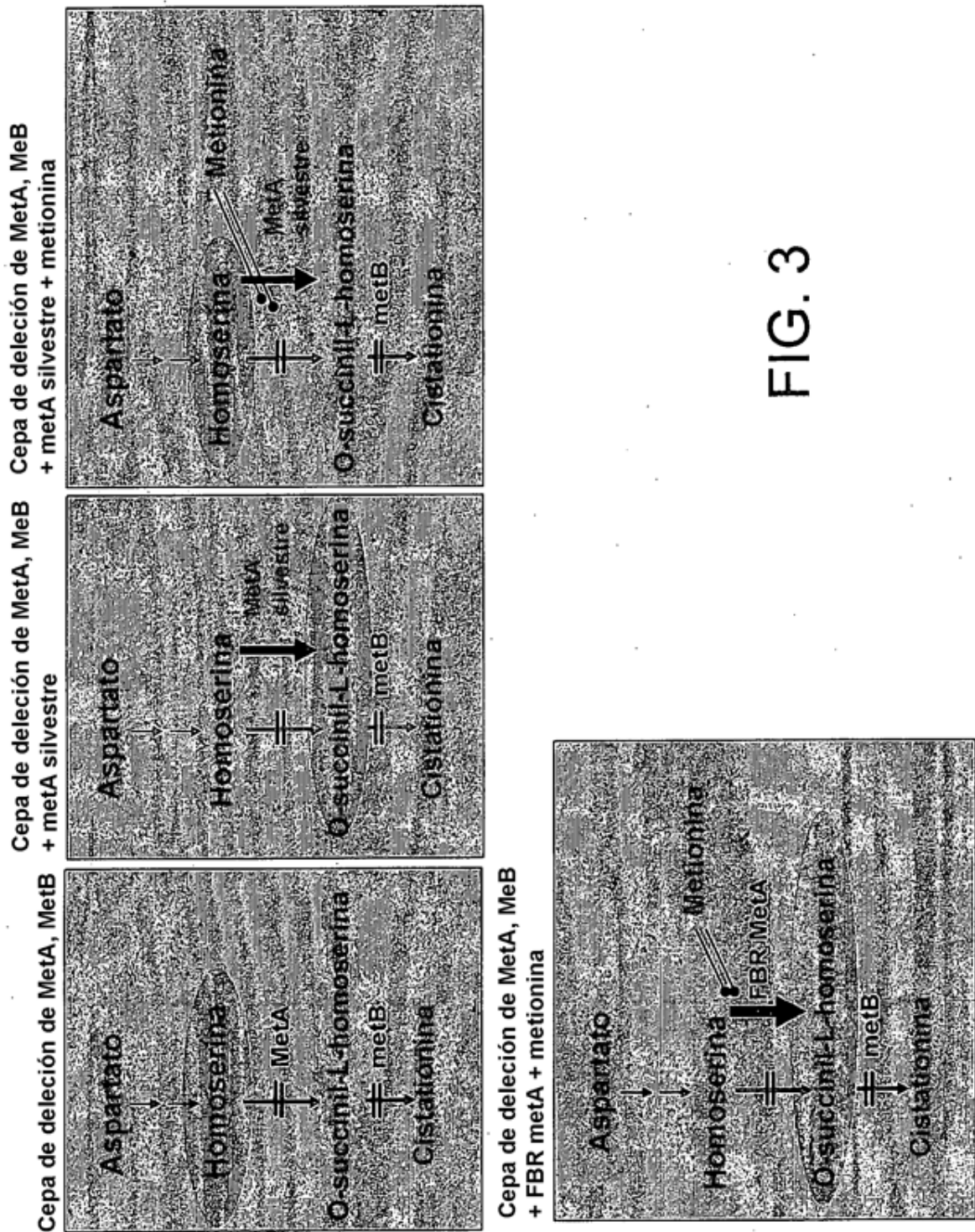


FIG. 3

FBR metA: metA resistente a la retroalimentación

FIG.4

Acumulación de metionina en TF4076BJF

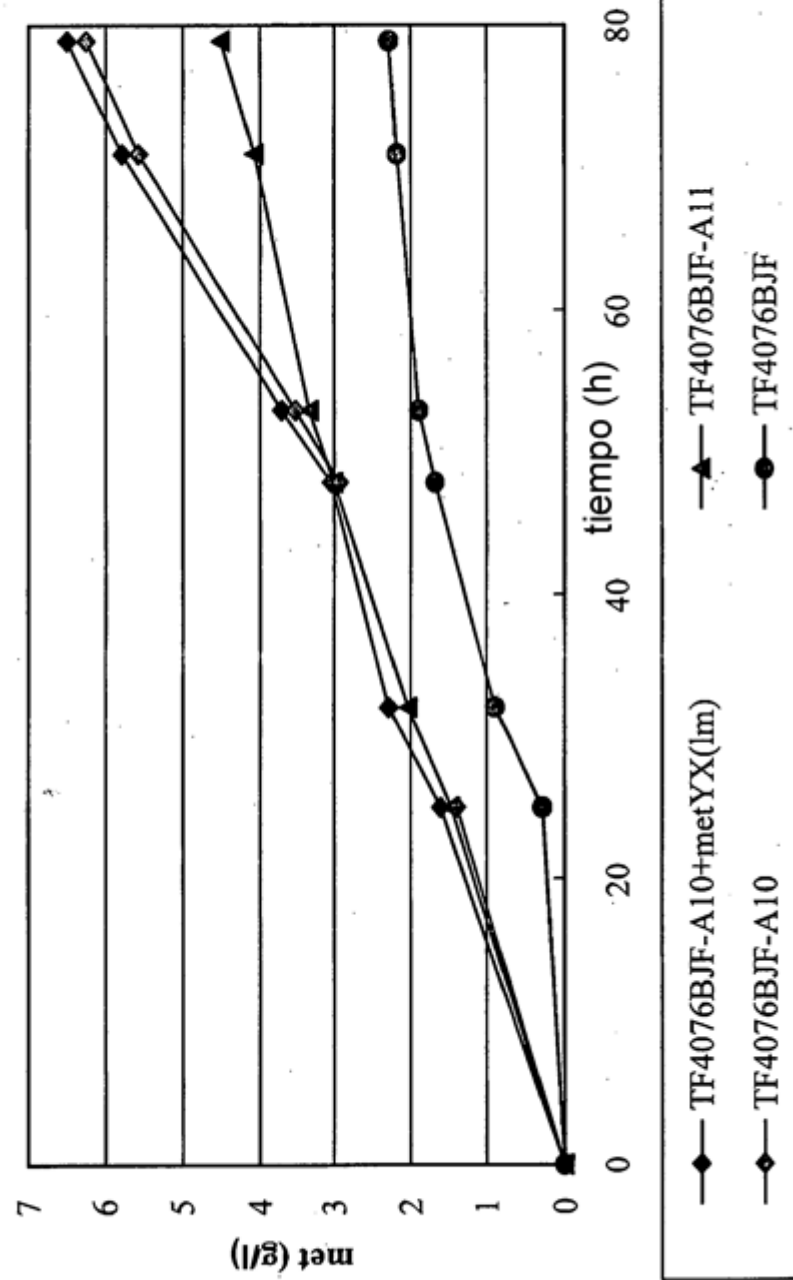
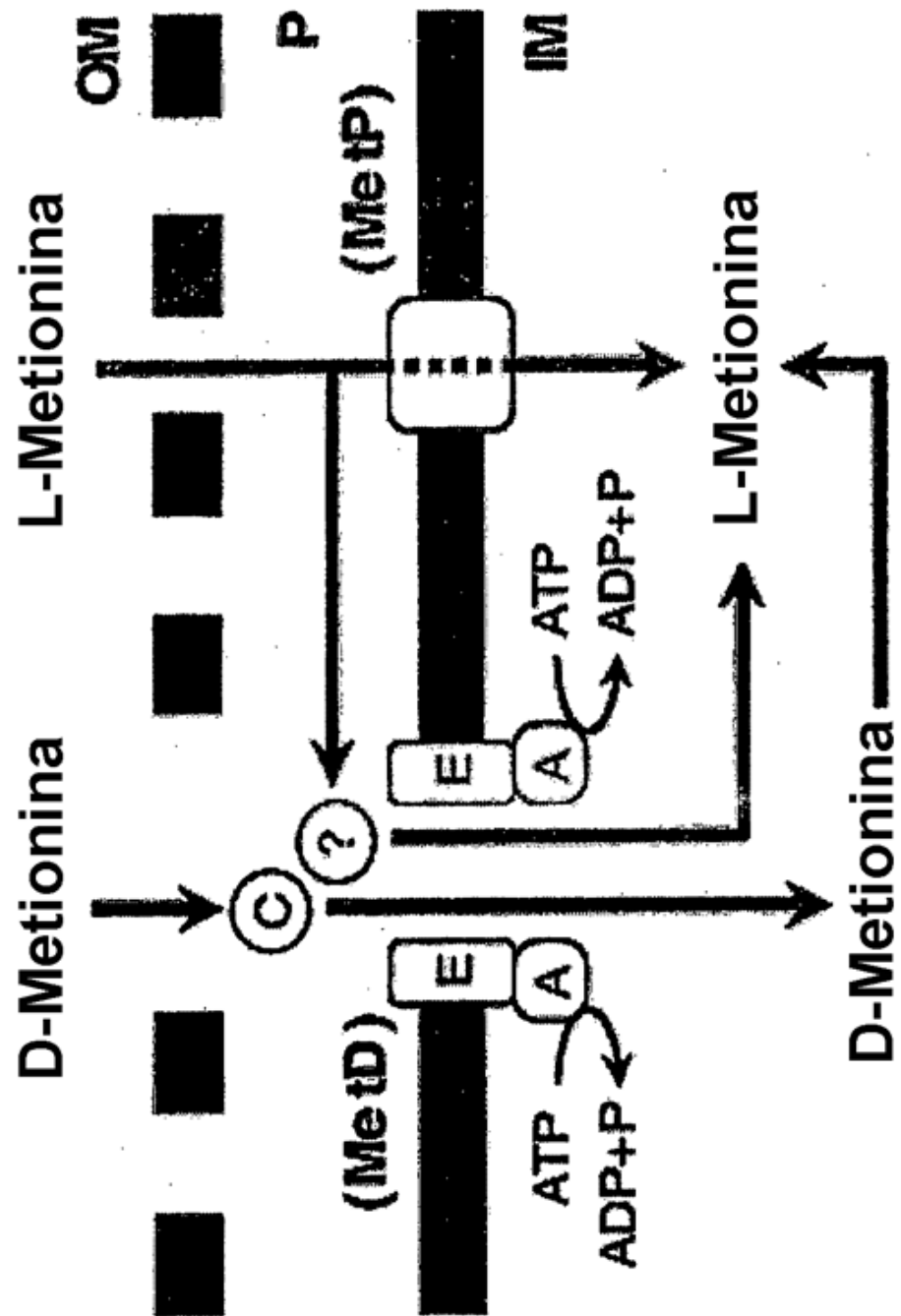


FIG. 5



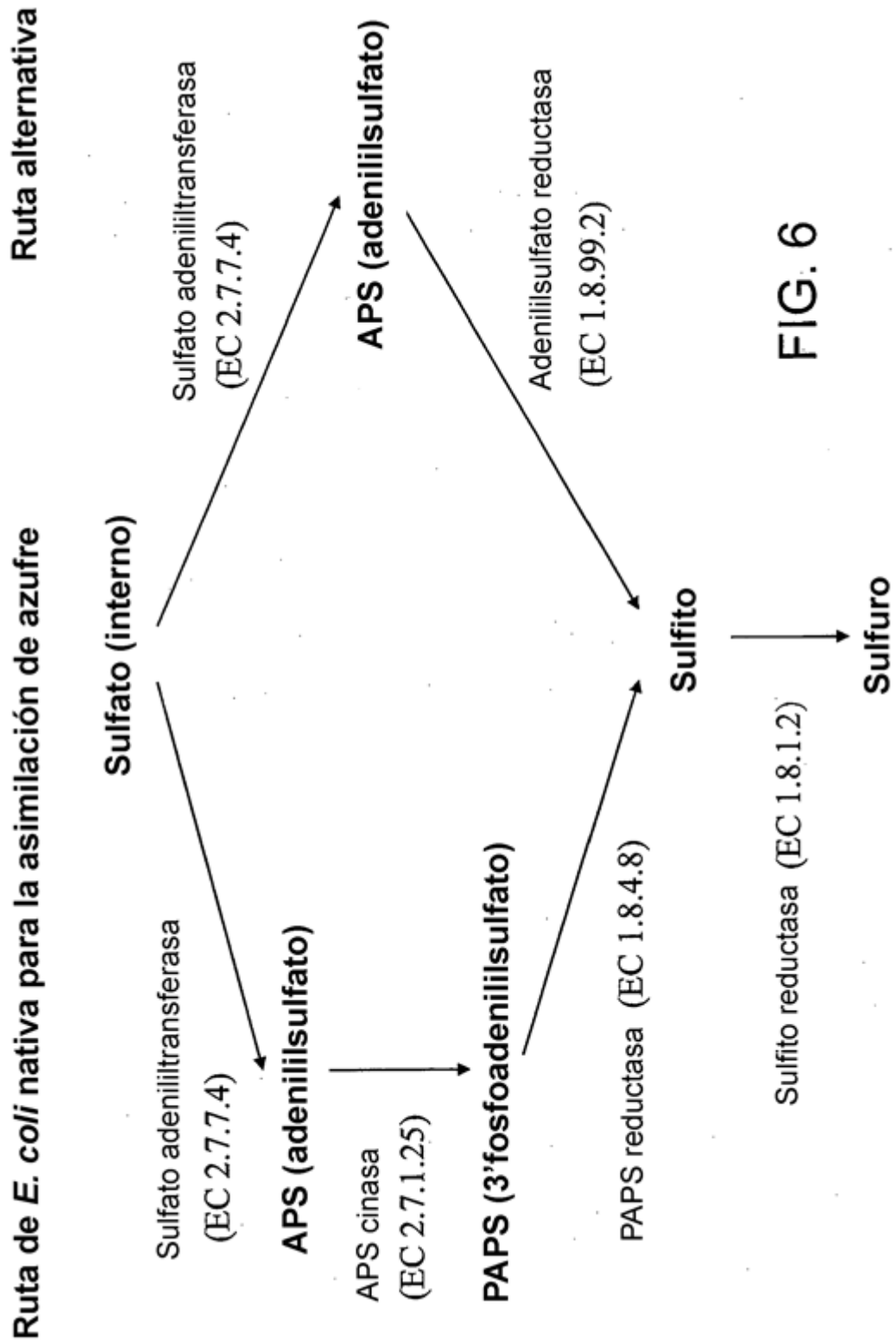


FIG. 6