

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 906**

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 14173994 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2808382**

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2016

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 2 575 906 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 producir metionina

5 **Campo**

Se divulgan composiciones, tal como microorganismos, enzimas y sustancias químicas, así como métodos para usar las mismas para producir metionina y productos relacionados.

10 **Antecedentes**

La metionina es un aminoácido esencial en la dieta animal. La metionina se ha producido sintéticamente durante un periodo extenso de tiempo mediante varias síntesis químicas multipaso que emplean acroleína, metilmercaptano y cianuro como materiales de partida. Hay dos formas de producto: D,L metionina y su análogo hidroxilado. La D-metionina se convierte en el isómero L requerido *in vivo*, a diferencia de todos los otros aminoácidos. Se ha descrito que el mercado para metionina de grado alimenticio está mejorando debido a la demanda aumentada en suplementos alimenticios de aves de corral y más recientemente de cerdo. La capacidad de los productores de metionina líderes (Degussa AG, Adisseo, y Novus) de cumplir la demanda del mercado depende de los suministros de materias primas. Los intermedios acroleína y metilmercaptano se deben convertir en 3-metilpropionaldehído (MMP) y después en metionina usando cianuro de hidrógeno. Los tres productores tienen planes para la expansión de sus instalaciones de producción de metionina e integración con la producción de materias primas también (Chem. Marketing Reporter 7 de abril, 2003).

Las rutas biosintéticas para metionina (un miembro de la familia del aspartato de aminoácidos) se han estudiado en un número de organismos y muestran similitudes, así como diferencias. El primer paso especializado, acilación de homoserina está catalizado por homoserina aciltransferasa, y es ubicuo en todos los organismos a pesar de las diferencias en el grupo acilo transferido. El producto de catálisis de *metA* es o bien acetilhomoserina o succinilhomoserina. La acilhomoserina se convierte después en homocisteína a través de una ruta de transsulfuración o una de sulfhidrilación directa. Se ha descrito que ambas rutas están presentes y son funcionales en levadura, hongos, plantas verdes y la bacteria *Corynebacterium glutamicum*. *E. coli* posee solo la ruta de transsulfuración. La ruta de transsulfuración va a través de cistationina como un intermedio y utiliza cisteína como un donante de azufre. La ruta de sulfhidrilación directa implica la incorporación directa de sulfuro en la acilhomoserina. El último paso en la ruta implica la conversión de homocisteína en metionina catalizado por una homocisteína metiltransferasa, codificada por los genes *metE* o *metH*.

Otros aminoácidos importantes, tal como lisina, treonina, y triptófano se producen a través de fermentación para uso en pienso animal. Por tanto, estos aminoácidos se pueden hacer usando glucosa y otros recursos renovables como materiales de partida. Desafortunadamente, la producción de metionina a través de fermentación no ha sido tan exitosa y la síntesis química de metionina aún se usa hoy. Esto se debe en parte a la falta de una ruta biosintética manipulada eficaz para la producción de metionina, y un huésped de producción apropiado.

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

45 **Compendio**

La producción de metionina y productos relacionados, tal como S-adenosilmetionina (SAME), por fermentación se describe en el presente documento. También se describen microorganismos que se han manipulado genéticamente para incluir moléculas de ADN recombinante y producir metionina.

Se describe un microorganismo que incluye una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica un péptido que tienen actividad de sulfhidrilación directa (EC 2.5.1.49, EC 4.2.99-), y secuencias de ácido nucleico endógenas que tienen actividad de transsulfuración (EC 2.5.1.48 y 4.4.1.8). Este microorganismo puede producir metionina y productos relacionados. En algunos ejemplos, el microorganismo puede tener al menos 0,1, 1, 2, 5, 10, 50, 75, 90, o al menos 100 g/ml de concentración extracelular de metionina o SAME.

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

En otros ejemplos, más de dos rutas biosintéticas de metionina pueden estar 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.

65

En algunos ejemplos, los microorganismos manipulados para hacer metionina y productos relacionados, tal como SAME, producen al menos el 10% de la metionina de actividad de la ruta biosintética de transsulfuración. En otros ejemplos producen al menos el 20, 30, 40, o al menos el 50% del producto de la actividad de la ruta biosintética de transsulfuración.

En algunos ejemplos, los microorganismos manipulados para hacer metionina y productos relacionados, tal como SAME, producen al menos el 10% de la metionina de actividad de la ruta biosintética de sulfhidrilación directa. En otros ejemplos producen al menos el 20, 30, 40, o al menos el 50% del producto de la actividad de la ruta biosintética de sulfhidrilación directa.

En algunos ejemplos, el microorganismo manipulado para hacer metionina y productos relacionados, se ha manipulado además 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 ha manipulado además para sobreexpresar uno o más genes, tal como los genes *metA*, *metB*, *metC*, *metE*, *metY*, *metZ*, *metX*, *metH*, *cysPWUA*, *cysD*, *cysN*, *cysC*, *cysH*, *cysl*, *cysJ*, *cysG*, *cysK* y *cysM*.

También se proporcionan métodos de hacer metionina y SAME. Estos métodos incluyen cultivar el microorganismo manipulado para hacer 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 novedosas de ácido nucleico y sus correspondientes secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 1 y 2). Estas secuencias de ácido nucleico, así como fragmentos y variantes de estas secuencias de ácidos nucleicos, son útiles para producir péptidos en microorganismos recombinantes. Los péptidos son útiles, entre otros, para producir metionina y SAME. Los péptidos, variantes de los mismos, y fragmentos de los mismos, también son útiles para producir agentes de unión específicos tal como anticuerpos.

También se divulga un método para mejorar la asimilación de azufre, evitando el intermedio fosfoadenilil sulfato (PAPS). Este método se puede usar 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 o 1.8.4.9). La sobreexpresión puede ser de introducir secuencias de ácido nucleico recombinante que alteran o introducen nuevos elementos de control, tal como promotores o potenciadores, que producen un aumento en la producción de adenilil sulfato reductasa endógena o la secuencia de ácido nucleico recombinante puede codificar adenilil sulfato reductasa.

Este y otros aspectos de la divulgación son aparentes de la siguiente descripción detallada y ejemplos ilustrativos.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1** es un diagrama que muestra tres rutas generales usadas por varios microorganismos para producir metionina. Todas las rutas se basan en parte en el uso de aspartato como un precursor para la producción de metionina. El aspartato se convierte mediante múltiples pasos en homoserina, la homoserina se convierte en O-acetilhomoserina u O-succinilhomoserina por MetA o MetX. Algunos microorganismos, tal como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* utilizan polipéptidos MetA para hacer O-succinilhomoserina mientras que otros microorganismos, tal como *Corynebacterium* y *Leptospira sp.* usan MetX para hacer O-acetilhomoserina. O-succinilhomoserina y O-acetilhomoserina se pueden convertir después bien directamente en homocisteína mediante sulfhidrilación, o se pueden convertir en homocisteína mediante transsulfuración (ambas reacciones se describen en más detalle en el presente documento). Las enzimas asociadas con la transsulfuración se identifican con dos asteriscos (**), y las enzimas asociadas con sulfhidrilación se identifican con un único asterisco (*).

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

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

La **figura 4** muestra una evolución temporal de la acumulación de metionina producida por una cepa que expresa genes *metA* resistentes a 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 y una alternativa novedosa.

Lista de secuencias

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos enumeradas en la lista de secuencias acompañante se muestran usando abreviaturas de letra estándar para bases nucleotídicas, y el código de tres letras para aminoácidos. Solo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida mediante cualquier referencia a la hebra mostrada.

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

SEQ ID NO: 11-34 muestran varias secuencias de cebadores usadas en los ejemplos.

Descripción detallada

Abreviaturas y términos

Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento “comprender” significa “incluir” y las formas singulares “un” o “una” o “el” o “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. 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 homocisteína sintasa” incluye referencia a uno o más péptidos homocisteína sintasa y equivalentes de los mismos que conocen los expertos en la materia, y así sucesivamente. El término “o” se refiere a un único elemento de elementos alternativos mencionados o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto claramente indique 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 a una combinación tanto de actividad homocisteína sintasa como de actividad cistationina γ -sintasa.

A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende el experto en la materia a la que pertenece esta divulgación. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente divulgación, los métodos y materiales adecuados se describen posteriormente. Los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no se pretende que sean limitantes. Otras características y ventajas de la divulgación son aparentes de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Números de acceso: Los números de acceso a lo largo de esta descripción derivan de la base de datos del NCBI (Centro Nacional para Información en Biotecnología) mantenido por el Instituto Nacional de Salud, EE UU. Los números de acceso son como se proporcionan en la base de datos el 20 de febrero, 2007.

Números de clasificación de enzimas (EC): Los números EC proporcionados a lo largo de esta descripción derivan de la base de datos KEGG Ligand, mantenida por la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genómica, patrocinada en parte por la Universidad de Tokio. Los números EC son como se proporcionan en la base de datos el 20 de febrero, 2007.

Atenuar: Reducir el impacto, actividad o potencia de algo. En un ejemplo, la sensibilidad de una enzima particular a inhibición por retroalimentación o inhibición causada por una composición que no es un producto o un reactivo (retroalimentación no específica de la ruta) se reduce de modo que la actividad enzimática no está impactada por la presencia de un compuesto. Por ejemplo, el gen *metA* y su correspondiente secuencia de aminoácidos (tal como las secuencias ejemplares proporcionadas en SEQ ID NO: 2) muestran varias mutaciones que atenúan su sensibilidad a inhibición por retroalimentación. La atenuación de la sensibilidad de *MetA* se describe en más detalle en ejemplo 3.B. En otro ejemplo, se puede hacer referencia a una enzima que es menos activa como atenuada.

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

Delección: 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 ambos lados unidas.

Detectable: Capacidad de tener una existencia o presencia determinada. Por ejemplo, la producción de un producto a partir de un reactivo, por ejemplo, la producción de O-succinilhomoserina u homocisteína, es detectable si la señal generada del producto o el reactivo, es lo suficientemente fuerte para ser medida.

Actividad de sulfhidrilación directa: La capacidad de reaccionar de OSHS u OAHS directamente con S^{2-} para producir homocisteína. Los péptidos que tienen esta actividad incluyen, por ejemplo, homocisteína sintasa (EC 4.2.99.-, EC 2.5.1.49) que están codificados 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 repetitivas en los 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 desoxirribosa al que está unido un grupo fosfato. Tripletas de nucleótidos, denominados codones, en las moléculas de ADN codifican aminoácidos 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: 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 colocó en la célula usando técnicas de ingeniería recombinante. Por ejemplo, un gen que estaba en la célula cuando la célula se aisló originalmente de la naturaleza. Un gen se considera todavía endógeno si las secuencias de control, tal como un promotor o secuencias potenciadoras que activan la transcripción o traducción se han alterado mediante técnicas recombinantes.

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

Expresión: El proceso por el que la 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 a ARNm y después se traducen a proteína y los que se transcriben a ARN, pero no se traducen a proteína (por ejemplo, ARN de transferencia y ribosómico).

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

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína o célula) se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en los que el componente se produce de forma natural, tal como otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, y proteínas. Las moléculas de ácido nucleico y proteínas que se han "aislado" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también abarca moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas por 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 natural que no es inmediatamente contigua con ambas de las secuencias con las que es inmediatamente contigua (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del que deriva.

Molécula de ácido nucleico: Abarca moléculas tanto de ARN como ADN incluyendo, sin limitación, ADNc, ADN genómico, y ARNm. Incluye moléculas de ácido nucleico sintéticas, tal como las que se sintetizan químicamente o se producen recombinantemente. La molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria. Si 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 con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está colocada 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 la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN operativamente unidas son contiguas y, donde sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína, están en el mismo marco de lectura. Las configuraciones de los genes separados que se transcriben en tándem como un único ARN mensajero se denominan operones. Por tanto, colocar genes en proximidad, por ejemplo, en un vector plasmídico, bajo la regulación transcripcional de un único promotor, constituye un operón sintético.

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

Purificado: El término purificado no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de péptido purificado, tal como una preparación de succinilCoA homoserina aciltransferasa, o una homocisteína sintasa, es una en la que el péptido está más concentrado de lo que el péptido está en su medio dentro de una célula. Por ejemplo, un péptido purificado es uno que está sustancialmente separado de los 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, tal como esos que podrían estar presentes después de la síntesis química del péptido.

En un ejemplo, un péptido se purifica cuando al menos aproximadamente el 50% en peso de una muestra está compuesta del péptido, por ejemplo, cuando al menos aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98% o 99% o más de una muestra está compuesta del péptido. Los ejemplos de métodos que se pueden usar para purificar un péptido incluyen, pero no están limitados a los métodos divulgados en Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, Cap. 17). La pureza de la proteína se puede determinar, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido por la visualización de una única banda peptídica tras teñir el gel de poliacrilamida; cromatografía líquida de 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 forma natural, tiene una secuencia que se hace por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otra manera, o ambos. Esta combinación artificial se puede alcanzar, por ejemplo, mediante síntesis química o por 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 del que se aisló el ácido nucleico.

Identidad/similitud de secuencia: La identidad/similitud entre dos o más secuencias de ácido nucleico, o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia se puede medir en términos de porcentaje de identidad; cuanto mayor sea el porcentaje, más idénticas son las secuencias. La similitud de secuencia se puede medir en términos de porcentaje de similitud (que considera sustituciones conservadoras de aminoácidos); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las secuencias. Homólogos y ortólogos de secuencias de ácido nucleico o aminoácidos poseen un grado relativamente alto de identidad/similitud de secuencia cuando se alinean usando métodos estándar.

Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Se describen varios programas y algoritmos de alineamiento 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.*, *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990, presenta una consideración detallada de métodos de alineamiento de secuencias y cálculos de homología.

La herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST) del NCBI (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990) está disponible de varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional para Información Biológica (NCBI, National Library of Medicine, Edificio 38A, Oficina 8N805, Bethesda, MD 20894) y en la Internet, para uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastn. Se puede encontrar información adicional en la página web del NCBI.

Se usa BLASTN 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 se pueden ajustar como sigue: se ajusta -i a un fichero que contiene la primera secuencia de ácido nucleico que se va a comparar (tal como C:\seq1.txt); se ajusta -j a un fichero que contiene la segunda secuencia de ácido nucleico que se va a comparar (tal como C:\seq2.txt); se ajusta -p a blastn; se ajusta -o a cualquier nombre de fichero deseado (tal como C:\output.txt); se ajusta -q a -1; se ajusta -r a 2; y todas las otras opciones se dejan en su ajuste por defecto. Por ejemplo, se puede usar el siguiente comando para generar un fichero 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.

Para comparar dos secuencias de aminoácidos, las opciones de B12seq se pueden ajustar como sigue: se ajusta -i a un fichero que contiene la primera secuencia de aminoácidos que se va a comparar (tal como C:\seq1.txt); se ajusta -j a un fichero que contiene la segunda secuencia de aminoácidos que se va a comparar (tal como C:\seq2.txt); se ajusta -p a blastp; se ajusta -o a cualquier nombre de fichero deseado (tal como C:\output.txt); y todas las otras opciones se dejan en su ajuste por defecto. Por ejemplo, se pueden usar el siguiente comando para generar un fichero 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 fichero de salida designado presentará esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos

secuencias comparadas no comparten homología, entonces el fichero de salida designado no presentará secuencias alineadas.

5 Una vez alineadas, se determina el número de coincidencias contando el número de posiciones donde está presente un nucleótido o residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias. El porcentaje de identidad de secuencia se determina dividiendo el número de coincidencias bien por la longitud de la secuencia mostrada en la secuencia identificada, o por una longitud articulada (tal como 100 nucleótidos o residuos de aminoácidos consecutivos de una secuencia mostrada en una secuencia identificada), seguido por multiplicar el valor resultante por 100. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que tiene 1166 coincidencias cuando se alinea con una secuencia de prueba que
10 tiene 1554 nucleótidos es el 75,0 por ciento idéntica a la secuencia de prueba ($1166 \div 1554 * 100 = 75,0$). El valor del porcentaje de identidad de secuencia se redondea a la décima más próxima. Por ejemplo, 75,11, 75,12, 75,13 y 75,14 se redondean a la baja a 75,1, mientras que 75,15, 75,16, 75,17, 75,18 y 75,19 se redondean al alza a 75,2. El valor de la longitud siempre será un número entero.

15 Para comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30 aminoácidos, se emplea la función de secuencias Blast 2 usando la matriz por defecto BLOSUM62 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 típicamente por la posesión de al menos el 70% de identidad de secuencia contado a lo largo del alineamiento de longitud completa con una secuencia de aminoácidos usando Basic Blast 2.0, gapped blastp de NCBI con bases de datos tales como
20 las bases de datos nr o swissprot. Las secuencias problema analizadas con el programa blastn se filtran con DUST (Hancock y Armstrong, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:67-70). Otros programas usan SEG. Además, se puede realizar un alineamiento manual. Las proteínas con incluso mayor similitud mostrarán porcentaje creciente de identidades cuando se evalúan por este método, tal como al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, o al menos el 99% de identidad de secuencia respecto a la
25 secuencia objeto (es decir, la secuencia identificada por el número de acceso o similar), mientras que se retiene la actividad de la secuencia objeto. En algunos ejemplos, la secuencia objeto tendrá mayor actividad que la de la secuencia nativa y en aún otros ejemplos será menos activa.

30 Cuando se alinean péptidos cortos (menores de aproximadamente 30 aminoácidos), el alineamiento se debe realizar usando la función de secuencia Blast 2, empleando la matriz PAM30 ajustada a parámetros por defecto (penalizaciones de apertura de hueco 9, extensión de hueco 1). Las proteínas con incluso mayor similitud respecto a la secuencia de referencia mostrarán porcentaje creciente de identidades cuando se evalúan por este método, tal como al menos el 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia. Cuando se
35 compara menos de la secuencia entera para identidad de secuencia, los homólogos típicamente poseen al menos el 75% de identidad de secuencia a lo largo de ventanas pequeñas de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de secuencia de al menos el 85%, 90%, 95% o 98% dependiendo de su identidad respecto a la secuencia de referencia. Los métodos para determinar la identidad de secuencia a lo largo de tales ventanas cortas se describen en la página web del NCBI.

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

50 El experto en la materia apreciará que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan solo para orientación; es posible que se pudieran obtener homólogos fuertemente significativos que estén 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, por técnicas de biología molecular. La transformación abarca todas las técnicas por las que una molécula de ácido
55 nucleico se puede introducir en tal célula incluyendo, pero no limitado a, transfección con vectores víricos, conjugación, transformación con vectores plásmidos, e introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección, y aceleración con cañón de partículas.

Actividad de transsulfuración: Una actividad que produce metionina o SAME a través del intermedio cistationina. Los péptidos que tienen esta actividad incluyen cistationina γ sintasa (EC 2.5.1.48) y cistationina β liasa (EC 4.4.1.8),
60 estos péptidos están codificados por los genes *metB* y *metC*, respectivamente. Se puede usar cualquier combinación de péptidos cistationina γ sintasa (EC 4.2.99.9) y cistationina β liasa (EC 4.4.1.8) para permitir a un microorganismo poseer actividad de transsulfuración.

65 **En condiciones que permiten la producción del producto:** Cualesquiera condiciones de fermentación que permitan a un microorganismo producir un producto deseado, tal como metionina o SAME. Las condiciones

habitualmente incluyen temperatura, aeración 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 pueda ser metabolizada por el microorganismo directamente, o se pueden usar enzimas en el medio para facilitar metabolizar la fuente de carbono. Para determinar si las condiciones de cultivo permiten la producción del producto, el microorganismo se puede cultivar durante 24, 36 o 48 horas y se puede tomar una muestra. Las células en la muestra se pueden probar después para la presencia del producto deseado. Por ejemplo, cuando se prueba la presencia de metionina o SAME se pueden usar los ensayos proporcionados en la sección de ejemplos.

Vector: Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula, que produce de esta manera 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 de marcadores seleccionables u otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

Descripción detallada

I. Rutas de producción de metionina

Como se muestra en la figura 1, se pueden usar muchas rutas biosintéticas para producir metionina o sus intermedios tal como fosfato de aspartilo, aspartato semialdehído, homoserina, O-succinilhomoserina (OSHS), O-acetilhomoserina (OAHS), cistationina, homocisteína, metionina, y S-adenosil metionina (SAME). Para los fines de esta divulgación un intermediario se puede denominar un reactivo o un producto, dependiendo del contexto. Por ejemplo, cuando se discute la conversión de aspartato a fosfato de aspartilo usando una aspartato quinasa, el aspartato es el reactivo y el fosfato de aspartilo es el producto. Similarmente, cuando la descripción describe la conversión de fosfato de aspartilo a aspartato semialdehído usando una aspartato semialdehído deshidrogenasa, el fosfato de aspartilo es el reactivo y el aspartato semialdehído es el producto. Un experto en la materia apreciará que la figura 1 muestra muchas rutas biosintéticas porque dentro de cada clase de enzima proporcionada allí hay muchas enzimas que se pueden usar para convertir un reactivo en un producto y, por tanto, hacen una ruta. Además, estas reacciones se pueden llevar a cabo *in vivo*, *in vitro* o mediante una combinación de reacciones *in vivo* y reacciones *in vitro*, tal como reacciones *in vitro* que incluyen reacciones químicas no enzimáticas.

Al microorganismo huésped también se le pueden proporcionar intermedios en la ruta incluyendo los intermedios en materia prima de fermentación. Por tanto, si la ruta biosintética produce menos de una cantidad deseada de un intermedio determinado, ese intermedio se puede añadir a la materia prima. Esto se puede hacer bien en un marco de fermentación continua o en un marco de fermentación por lotes.

Los expertos en la materia reconocerán que un huésped de producción puede usar fuentes de carbono diferentes de glucosa. Fuentes de carbono alternativas incluyen, por ejemplo, sacarosa, fructosa, celulosa, hemicelulosa, almidón, o glicerol. Cuando se usan fuentes alternativas de carbono 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 en la materia apreciará que hay muchos métodos de aumentar la concentración de aspartato en cepas de producción. Por ejemplo, aumentar la expresión de las enzimas piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa, alterar la derivación del glioxilato o eliminar el consumo de piruvato en otros productos tal como acetato o etanol.

Alternativamente, el aspartato se puede incluir en la materia prima de fermentación, ser tomado por el microorganismo, y usado como un reactivo en la ruta sintética de la metionina.

El aspartato también sirve como un intermedio en las rutas biosintéticas de lisina, treonina, y asparragina. Por tanto, puede ser deseable atenuar o eliminar (eliminación de secuencias génicas) estas rutas, lo que permite así que se use más aspartato en la ruta de producción de la metionina.

B. De aspartato a fosfato de aspartilo

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir fosfato de aspartilo, o para sobreproducir fosfato de aspartilo. Por ejemplo, la aspartato quinasa resistente a retroalimentación descrita en el documento WO04069996A2 se puede usar para sustituir una aspartato quinasa endógena o además de una aspartato quinasa endógena.

Como se usa en el presente documento, aspartato quinasa incluye péptidos en el número de clasificación de enzimas (EC) 2.7.2.4, así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de aspartato a fosfato de aspartilo. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos aspartato quinasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo, algunos péptidos aspartato quinasa aceptarán otros sustratos además de aspartato. Tales péptidos aspartato quinasa no específicos, por tanto, también están incluidos. Las secuencias de

aspartato quinasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los No. de acceso de GenBank: NZ_AAVY01000022, NC_006958, y NZ_AAWW01000055, divulgan secuencias de ácido nucleico de aspartato quinasa, y los No. de acceso de GenBank: NP_418448, NP_599504 y ZP_01638096 divulgan secuencias de péptidos aspartato quinasa. Los ensayos para caracterizar la actividad aspartato quinasa de un péptido particular se conocen bien la técnica. Por ejemplo, el ensayo descrito por Cohen, GN, *Methods in Enzymology*, 113:596:600, 198, se puede usar para caracterizar la actividad de un péptido específico.

C. De fosfato de aspartilo a aspartato semialdehído

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir aspartato semialdehído, o para sobreproducir aspartato semialdehído. Un método de aumentar la producción de productos en la ruta biosintética de la metionina es mediante la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de aspartato semialdehído deshidrogenasa.

Como se usa en el presente documento, aspartato semialdehído deshidrogenasa incluye péptidos aspartato semialdehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.11), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de fosfato de aspartilo a aspartato semialdehído. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos aspartato semialdehído deshidrogenasa catalizarán también otras reacciones. Por ejemplo, algunos péptidos aspartato semialdehído deshidrogenasa aceptarán otros sustratos además de fosfato de aspartilo, y, por tanto, tales péptidos aspartato semialdehído deshidrogenasa no específicos también están incluidos. Las secuencias de aspartato semialdehído deshidrogenasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los No. de acceso de GenBank: NC_006958, NZ_AAVY01000015 y NZ_AAWW01000010 divulgan secuencias de ácido nucleico de aspartato semialdehído deshidrogenasa y los números de acceso de GenBank: NP_417891, NP_599505 y ZP_0164))72 divulgan secuencias de péptidos aspartato semialdehído deshidrogenasa. Los ensayos para caracterizar la actividad aspartato semialdehído deshidrogenasa de un péptido particular se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el ensayo descrito por Cohen, GN., *Methods in Enzymology*, 113:600-602, 1985, para caracterizar la actividad de un péptido específico.

D. De aspartato semialdehído a homoserina

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir homoserina, o para sobreproducir homoserina. Un método de aumentar la producción de productos en la ruta biosintética de la metionina es mediante la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de aspartato semialdehído deshidrogenasa.

Como se usa en el presente documento, homoserina deshidrogenasa incluye péptidos homoserina deshidrogenasa (EC 1.1.1.3), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de aspartato semialdehído a homoserina. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos homoserina deshidrogenasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos homoserina deshidrogenasa aceptarán otros sustratos además de aspartato semialdehído. Tales péptidos homoserina deshidrogenasa no específicos están, por tanto, también incluidos. Las secuencias de péptidos homoserina deshidrogenasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los No. de acceso de GenBank: NC_006958, NZ_AAVY01000013 y NZ_AAWW01000033 divulgan secuencias de ácido nucleico de homoserina deshidrogenasa y los números de acceso de GenBank: NP_414543, ZP_01639819 y NP_600409 divulgan secuencias de péptidos de homoserina deshidrogenasa. Los ensayos para caracterizar la actividad homoserina deshidrogenasa de un péptido particular se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el ensayo descrito por Patte et al., *Biochem.Biophys.Acta* 128:426-439, 1966, para caracterizar la actividad de un péptido específico.

E. De homoserina a O-succinilhomoserina (OSHS)

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir O-succinilhomoserina (OSHS), o para sobreproducir OSHS. Un método de aumentar la producción de productos en la ruta biosintética de la metionina es mediante la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos homoserina O-succiniltransferasa, o usar una forma insensible a retroalimentación de péptidos homoserina O-succiniltransferasa.

Como se usa en el presente documento, succinilCoA homoserina aciltransferasa, incluye péptidos homoserina O-succiniltransferasa (EC 2.3.1.46), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de homoserina a OSHS. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos homoserina O-succiniltransferasa catalizarán otras reacciones también, por ejemplo, algunos péptidos succinilCoA homoserina aciltransferasa aceptarán otros sustratos además de homoserina. Tales péptidos succinilCoA homoserina aciltransferasa no específicos, por tanto, también están incluidos. Las secuencias de péptidos homoserina O-succiniltransferasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, el número de acceso de GenBank: NZ_AAWW01000055 divulga una secuencia de ácido nucleico de homoserina O-succiniltransferasa y el número de acceso de Genbank AAC76983 divulga una secuencia de péptido homoserina O-succiniltransferasa. Los ensayos para caracterizar la actividad

succinilCoA homoserina aciltransferasa se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el ensayo descrito por Lawrence, *J. Bacteriol.*, 109:8-11, 1972, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos succinilCoA homoserina aciltransferasa también se denominan en el presente documento *metA*.

5

F. De homoserina a O-acetilhomoserina (OAHS)

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir O-acetilhomoserina (OAHS), o para sobreproducir OAHS. Un método de aumentar la producción de productos en la ruta biosintética de la metionina es mediante la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos homoserina O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31).

10

Como se usa en el presente documento, homoserina O-acetiltransferasa, incluye péptidos homoserina O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión a OAHS. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos homoserina O-acetiltransferasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos homoserina O-acetiltransferasa aceptarán otros sustratos además de homoserina. Tales péptidos homoserina O-acetiltransferasa no específicos, por tanto, también están incluidos. Las secuencias de los péptidos homoserina O-acetiltransferasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: REGIÓN Y10744: 2822..3961, REGIÓN NZ_AAAH02000004: 166057..167193 y REGIÓN NZ_AAAY02000081: complemento(11535..12605) divulgan secuencias de ácido nucleico de homoserina O-acetiltransferasa y los números de acceso de GenBank: CAA71733, ZP_00766367 y ZP_00107218 divulgan secuencias de péptidos homoserina O-acetiltransferasa. Los ensayos para caracterizar la actividad homoserina O-acetiltransferasa se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el ensayo descrito por Lawrence, *J. Bacteriol.*, 109:8-11, 1972, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos homoserina O-acetiltransferasa también se denominan en el presente documento *metX*.

25

G. Sulfhidrilación

La producción de homocisteína por sulfhidrilación directa se logra por enzimas homocisteína sintasa, algunas de estas enzimas utilizan OSHS como sustrato, y algunas utilizan OAHS como sustrato. Además, algunas de las enzimas pueden utilizar bien OSHS u OAHS como sustratos.

30

1. De O-succinilhomoserina (OSHS) a homocisteína

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o para sobreproducir homocisteína. Un método de aumentar la producción de productos en la ruta biosintética de la metionina es mediante la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos homocisteína sintasa (EC 4.2.99.-).

35

Como se usa en el presente documento, homocisteína sintasa incluye péptidos homocisteína sintasa (EC 4.2.99.-), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de O-succinilhomoserina (OSHS) a homocisteína. La conversión de OSHS a homocisteína mediante la reacción con sulfuro se denomina en el presente documento sulfhidrilación directa. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos homocisteína sintasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos homocisteína sintasa aceptarán otros sustratos además de OSHS. Tales péptidos homocisteína sintasa no específicos, por tanto, también están incluidos. Las secuencias de péptidos homocisteína sintasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, el número de acceso de GenBank: AE004091 divulga una secuencia de ácido nucleico de homocisteína sintasa (O-succinil-L-homoserina sulfhidrilasa) y el número de acceso de GenBank: AAG06495 divulga una secuencia de aminoácidos de homocisteína sintasa (O-succinil-L-homoserina sulfhidrilasa). Los ensayos para caracterizar la actividad homocisteína sintasa de un péptido particular se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar 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 homocisteína sintasa también se denominan en el presente documento *metZ*.

40

45

50

2. De O-acetilhomoserina (OAHS) a homocisteína

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o para sobreproducir homocisteína. Un método de aumentar la producción de productos en la ruta biosintética de la metionina es mediante la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos homocisteína sintasa (EC 2.5.1.49).

60

Como se usa en el presente documento, homocisteína sintasa incluye péptidos homocisteína sintasa (EC 2.5.1.49), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de O-succinilhomoserina (OSHS) a homocisteína. La conversión de OAHS a homocisteína mediante la reacción con sulfuro se denomina en el presente documento sulfhidrilación directa. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos homocisteína sintasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos homocisteína sintasa aceptarán otros sustratos

65

además de OSHS, por ejemplo, la homocisteína sintasa descrita en el ejemplo 2, posteriormente acepta bien OAHS u OSHS como sustrato, tales péptidos homocisteína sintasa no específicos, por tanto, también están incluidos. Las secuencias de péptidos homocisteína sintasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: REGIÓN AE004091: 5655648..5656925, REGIÓN Y10744: 1485..2813, REGIÓN NZ_AA002000004: 164536..165990 y REGIÓN NZ_AAAY02000081: complemento(12750..14054) divulgan secuencias de ácido nucleico de homocisteína sintasa (O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa) y los números de acceso de GenBank: AAG08410, CAA71732, ZP_00766366 y ZP_00107219 divulgan secuencias de aminoácidos de homocisteína sintasa (O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa). Los ensayos para caracterizar la actividad homocisteína sintasa de un péptido particular se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar 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 homocisteína sintasa también se denominan en el presente documento *metY*.

H. Transsulfuración

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

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir cistationina, o para sobreproducir cistationina. Un método de aumentar la producción de productos en la ruta biosintética de la metionina es mediante la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos cistationina γ -sintasa (EC 2.5.1.48).

Como se usa en el presente documento, cistationina γ -sintasa incluye péptidos cistationina γ -sintasa (EC 2.5.1.48), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de OSHS u OAHS a cistationina. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos cistationina γ -sintasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos cistationina γ -sintasa aceptarán otros sustratos además de OSHS u OAHS. Tales péptidos cistationina γ -sintasa no específicos, por tanto, también están incluidos. Las secuencias de péptidos cistationina γ -sintasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: NC_006958, NZ_AAWW01000006 y NC_004129 divulgan secuencias de ácido nucleico de cistationina γ -sintasa y los números de acceso de GenBank: NP_418374, YP_348978 y NP_601979 divulgan secuencias de péptidos de cistationina γ -sintasa. Los ensayos para caracterizar la actividad cistationina γ -sintasa de un péptido particular se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el ensayo descrito en *Methods in Enzymology*, 17:425-433, 1971, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos cistationina γ -sintasa también se denominan en el presente documento *metB*.

2. De cistationina a homocisteína

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir homocisteína, o para sobreproducir homocisteína. Un método de aumentar la producción de productos en la ruta biosintética de la metionina es mediante la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos cistationina β -liasa (EC 4.4.1.8).

Como se usa en el presente documento, cistationina β -liasa incluye péptidos cistationina β -liasa (EC 4.4.1.8), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de cistationina a homocisteína. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos cistationina β -liasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos cistationina β -liasa aceptarán otros sustratos además de cistationina. Tales péptidos cistationina β -liasa no específicos, por tanto, también están incluidos. Las secuencias de péptidos cistationina β -liasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: NZ_AAWW01000001 NC_006958, y NZ_AAVY01000004 divulgan secuencias de ácido nucleico de cistationina β -liasa y los números de acceso de GenBank: NP_746463, YP_226552 y NP_417481 divulgan secuencias de péptidos de cistationina β -liasa. Los ensayos para caracterizar la actividad cistationina β -liasa de un péptido particular se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el ensayo descrito en *Methods in Enzymology*, 143:483-486, 1987, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos cistationina β -liasa también se denominan en el presente documento *metC*.

I. De homocisteína a metionina

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir metionina, o para sobreproducir metionina. Un método de aumentar la producción de productos, tal como metionina o SAME, en la ruta biosintética de la metionina es mediante la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos homocisteína metilasa (EC 2.1.1.14 y 2.1.1.13).

Como se usa en el presente documento, homocisteína metilasa incluye péptidos homocisteína metilasa (EC 2.1.1.14 y 2.1.1.13), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de homocisteína a metionina. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos homocisteína metilasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos homocisteína metilasa aceptarán otros sustratos además de

homocisteína. Tales péptidos homocisteína metilasa no específicos, por tanto, también están incluidos. Las secuencias de péptidos homocisteína metilasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: NC_004129, NC_006958 y NC_000913 divulgan secuencias de ácido nucleico de homocisteína metilasa y los números de acceso de GenBank: AP_004520, YP_225791 y CAK16133 divulgan secuencias de péptidos de homocisteína metilasa. Los ensayos para caracterizar la actividad homocisteína metilasa de un péptido particular se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el ensayo descrito en *Analytical Biochemistry*, 228, 323-329, 1995, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos homocisteína metilasa también se denominan en el presente documento *metH* o *metE*.

10 **J. De metionina a S-adenosilmetionina**

Los huéspedes de producción se pueden manipular usando polipéptidos conocidos para producir S-adenosilmetionina (SAME), o para sobreproducir SAME. Un método de aumentar la producción de productos, en la ruta biosintética de la metionina es mediante la sobreexpresión o la expresión de una forma más activa de péptidos metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6). Un experto en la materia apreciará que en casos donde metionina es el producto deseado, la actividad o expresión de péptidos metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6) codificados por *metK*, se puede atenuar.

Como se usa en el presente documento, metionina adenosiltransferasa incluye péptidos metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6), así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de metionina a SAME. Además, un experto en la materia apreciará que algunos péptidos metionina adenosiltransferasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos metionina adenosiltransferasa aceptarán otros sustratos además de metionina. Tales péptidos metionina adenosiltransferasa no específicos, por tanto, también están incluidos. Las secuencias de péptidos metionina adenosiltransferasa están públicamente disponibles. Por ejemplo, los números de acceso de GenBank: NC_002516, NC_006958 y NC_000913 divulgan secuencias de ácido nucleico de metionina adenosiltransferasa y los números de acceso de GenBank: NP_747070, CAI37180 y NP_600817 divulgan secuencias de péptidos de metionina adenosiltransferasa. Los ensayos para caracterizar la actividad metionina adenosiltransferasa de un péptido particular se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el ensayo descrito en *Methods in Enzymology*, 94: 219-222, 1983, para caracterizar la actividad de un péptido específico. Los genes que codifican péptidos metionina adenosiltransferasa también se denominan en el presente documento *metK*.

II. Ingeniería genética de cepas de producción para aumentar la producción de metionina

35 La producción de aspartato se puede aumentar usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la producción de aspartato se puede aumentar aumentando la cantidad de oxaloacetato producido 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).

40 La producción del producto también se puede aumentar sobreexpresando varios genes en la ruta biosintética de L-metionina. Por ejemplo, genes tales como *metA*, *metB*, *metC*, *metE*, y *metH*, *cysD*, *cysN*, *cysC*, *cysH*, *cysI*, *cysJ*, *cysK* y *cysM* se pueden colocar bajo el control de una variedad de promotores, lo que permite así que se produzcan mayores cantidades de estas enzimas.

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

55 Otro gen que se puede atenuar o delecionar 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*.

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

65 La modulación del gen *metK* también puede aumentar la producción de metionina y SAME. S-adenosilmetionina (SAME) es el donante de grupo metilo principal en todos los organismos y está implicada en la biosíntesis de

poliaminas. SAME también se conoce como metionina adenosiltransferasa (MAT o MetK, EC 2.5.1.6). MetK cataliza la única ruta conocida para la biosíntesis de SAME. La cadena tripolifosfato completa se corta de ATP y se forma el compuesto de sulfonio.

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

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

15 El sulfato es bastante poco reactivo y se debe convertir primero a una forma más reactiva para ser usado por la célula. En *E. coli* el sulfato se incorpora en la célula mediante un sistema de transporte periplásmico, compuesto de tres componentes de membranas citoplásmicos y una proteína de unión específica de sustrato localizada en el espacio periplásmico. Los tres componentes de membrana de la permeasa de sulfato están codificados por los genes *cysT*, *cysW*, y *cysA* (locus *cysA*). Los productos del locus *cysA* están regulados en concierto con el resto de la ruta de asimilación de sulfato como parte del regulón *cys*. El sulfato se activa después por acoplamiento a un nucleósido para hacer nucleósido fosfosulfatos de alta energía a través de una ruta que parece ser similar en la mayoría de los organismos.

20 Como se muestra en la figura 6, un microorganismo tal como *E. coli* utiliza una ruta que convierte el sulfato en adenilil sulfato (APS) usando un péptido sulfato adenilil transferasa (EC 2.7.7.4 codificado por *cysNcysD*). El APS se convierte después en PAPS por la APS quinasa (EC 2.7.1.25 codificado por *cysC*). Este paso requiere un ATP. PAPS se convierte en sulfito por una PAPS reductasa (EC 1.8.4.8 codificada por *cysH*) y el sulfito se reduce a sulfuro por NADPH-sulfito reductasa (EC 1.8.1.2 codificada por *cysIcysJcysG*). La ruta alternativa, mostrada en el lado derecho de la figura 6 convierte APS directamente en sulfito usando una adenilil sulfato reductasa (EC 1.8.9.92 o 1.8.4.9). Un experto en la materia apreciará que cualquier adenilil sulfato reductasa que pueda convertir APS en sulfito funcionará. Por ejemplo, la adenilil sulfato reductasa de *Bacillus subtilis* (número de acceso CAA04409), o de *Pseudomonas aeruginosa* (número de acceso NP_250447).

25 Se pueden introducir secuencias de ácido nucleico que codifican adenilil sulfato deshidrogenasa en cualquier microorganismo usado para producir metionina. Por ejemplo, las cepas descritas en el presente documento, así como las cepas descritas en los documentos W02005/108561 y W02006/138689 por Metabolic Explorer, y las descritas por Kumar y Gomes, *Biotechnology Advances* 23:41-61, 2005, se pueden beneficiar de la ruta divulgada que evita PAPS y, por tanto, requiere una molécula menos de ATP para la asimilación de sulfato.

Ejemplos

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

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

45 Como se ha descrito anteriormente, la producción endógena de metionina en *E. coli* se produce principalmente mediante la reacción de transsulfuración. Este ejemplo describe la manipulación de *E. coli* para aumentar la sulfhidrilación directa mientras que también se mantiene la ruta *metABC* endógena.

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

55 Más específicamente, *metZ* de *Pseudomonas aeruginosa* se clonó en auxótrofos para metionina de la cepa TF4076BJF, que se derivó de la cepa productora de treonina TF4076 (modificada además por la delección de *thrB* y *metJ*, y la inserción de *metF* bajo el control de promotor pTrc, descrita adicionalmente en el ejemplo 3, posteriormente). Estos auxótrofos tienen delección de bien *metB* o los genes *metB* y *metC*. *metZ* de *Pseudomonas aeruginosa* aumentó el crecimiento de los mutantes de delección de *metB* y *metBC* en medio mínimo. Incluso aunque en cultivos en matraz la producción de metionina no se recuperó por completo, la expresión de *metZ* induce la producción de metionina hasta ~100 mg/l en mutante de delección de *metBC*, como se muestra en la tabla 1. Esto indica que *metZ* es responsable para la producción de homocisteína en la célula.

60 La baja producción de metionina de los mutantes de delección transformados con *metZ* puede ser debida a la limitación de sulfuro en la fracción intracelular (los métodos de aumentar la concentración de sulfuro se proporcionan posteriormente). Esto está apoyado por el descubrimiento de que el crecimiento de la cepa de delección de *metBC*

transformada con *metZ* estaba aumentado en medio M9 en presencia de sulfuro de sodio 2 mM. En ensayos *in vivo*, la O-succinilsulfhidrilasa tenía baja afinidad por sulfuro. Mediante evolución dirigida, es posible desarrollar O-succinilsulfhidrilasas mejoradas con mayor afinidad por sulfuro y también mayor actividad. Una O-succinilsulfhidrilasa muy activa podría sustituir a *metB* y *metC* en la ruta de metionina, o podría complementar la ruta para aumentar el flujo de carbono a metionina.

[Tabla 1]
Complementación de crecimiento y producción de metionina en TF4076BFJ-ΔBC

TF4076BFJ-ΔBC	DO	Glucosa usada (g/l)	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

pProZ: *metZ* de *Pseudomonas aeruginosa* en el vector pProLar (ClonTech)

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

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

Como se muestra en la figura 1, *E. coli* produce metionina endógenamente usando los genes de la ruta de transsulfuración *metA*, *metB* y *metC* y va a través de OSHS. Se usó manipulación genética para añadir una ruta adicional a *E. coli* clonando y expresando los genes *metX* y *metY* en *E. coli*, lo que produjo un organismo huésped que hace metionina mediante tanto transsulfuración como sulfhidrilación directa simultáneamente.

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

Para evaluar si las enzimas *metX* y *metY* de *L. meyeri* podrían complementar el crecimiento de un auxótrofo para metionina de *E. coli*, el grupo génico *metYX* de *L. meyeri* se amplificó del plásmido *metYX*-pCR2.0-TOPO y se clonó en el vector pPRO-Nde-del. La transcripción de los genes *metYX* en este plásmido se inició por un promotor *lac/ara* situado en el vector.

Se evaluaron cuatro cepas de *E. coli* incluyendo W3110 Δ*metA* (que para la producción de OSHS), TF4076BJF (producción aumentada de homoserina), TF4076BJF Δ*metA* (que para la producción de OSHS), y TF4076BJF Δ*metAmetB* (que para la producción de OSHS y cistationina a partir de OAHS u OSHS). La cepa TF4076BJF es un auxótrofo para treonina, desregulado para la producción de metionina con un flujo de carbono aumentado hasta homoserina, que es capaz de producir metionina mediante la ruta natural de *E. coli*.

Las cepas se transformaron con el vector de clonación y el plásmido que contenía *metYX*, respectivamente. Los transformantes se sembraron en estrías después en placas de medio mínimo M9 que contenía glucosa (2 g/l), isoleucina (0,15 g/l), treonina (0,3 g/l), kanamicina (50 mg/l), e IPTG. El grupo génico *metYX* de *Leptospira meyeri* complementó el crecimiento de W3110 Δ*metA* en 24 horas. La cepa W3110 Δ*metA* que expresa solo *metX* no fue capaz de crecer en la placa mínima de M9. Por tanto, *E. coli* W3110 carece de una enzima eficaz para usar O-acetil-L-homoserina como el precursor para la biosíntesis de metionina. La cepa W3110 Δ*metA* transformada con el vector vacío control, pPRO-Nde-del, como se describe en el documento WO2006113897, no creció en 48 horas. La cepa TF4076BJF creció en placas de medio mínimo bien con el vector de clonación o el plásmido que contenía *metYX* de *L. meyeri*.

También se probaron genes *metYX* alternativos para complementación de crecimiento en medio mínimo. Al clonar los genes *metYX* de *D. radiodurans*, *C. aurantiacus*, *B. linens*, y *N. punctiforme*, la traducción del gen *metX* se acopló con la traducción del gen *metY* iniciado por un rbs situado en el vector, debido a la ausencia de un sitio de unión al ribosoma (rbs) eficaz en *E. coli* adyacente al gen posterior, *metX*.

El grupo génico *metYX* de *L. meyeri*, *D. radiodurans*, y *C. aurantiacus* eran los más eficaces en complementar el crecimiento de las cepas auxótrofas para metionina. La complementación del crecimiento también se observó en un

auxótrofo para metionina donde *metY* (*L. meyeri*) se sustituyó con el *metY* (*P. aeruginosa*) en el grupo génico *metYX* de *L. meyeri*. Estas células mostraron una velocidad de crecimiento reducida relativa al mismo auxótrofo para metionina que expresa el *metYX* de *L. meyeri*.

- 5 La producción de metionina se determinó usando el protocolo de matraz con agitación descrito en el ejemplo 3. Brevemente, se hicieron crecer cultivos a 30°C durante 50 horas en el medio suplementado con 150 mg/l de metionina (para mejorar el crecimiento inicial) y se midió la metionina por HPLC. La tabla 2 muestra que la producción de metionina era mayor en las cepas que tenían ambas rutas comparadas con esas donde solo la transulfuración la sulfhidrilación directa estaba disponible.

10

[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 metYX</i> (Lm)	5,8	23,6	368
TF4076BJF Δ <i>metA metY</i> (Pa) <i>metX</i> (Lm)	6,6	21,1	79
TF4076BJF Δ <i>metAB metYX</i> (Lm)	6,2	23,7	280
TF4076BJF Δ <i>metAB metYX</i> (Dr)	6,6	32,6	140

- 15 Los genes *metA* y *metB* son necesarios para la síntesis de metionina en cepas de *E. coli*. Cuando se inactiva cualquiera de los genes, *E. coli* pierde la capacidad de producción de metionina *de novo*. Los datos anteriores indican que la adición del operón *metYX* restablece la producción de metionina a niveles similares a los obtenidos con un protótrofo para metionina. La producción de metionina era en algunos casos 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 a metionina a través de ambas rutas.

20

- Para demostrar adicionalmente los beneficios de la ruta dual, las cepas se compararon en recipientes de fermentación de 5 litros usando el protocolo de fermentación descrito en el ejemplo 3. La acumulación de metionina empezó después de aproximadamente 24 horas y siguió hasta que se paró 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 observaron una acumulación significativa de homoserina y OAHS en estas fermentaciones. Se muestra una comparación de la producción de metionina en los fermentadores en la figura 2 y los datos se resumen en la tabla 3. Estos resultados confirmaron la observación vista en los matraces, que la producción de metionina se podría aumentar por la expresión adecuada de una ruta de sulfhidrilación directa heteróloga, y que esta ruta podría ser responsable de la mayoría de la producción de metionina si las enzimas se expresaban adecuadamente.

30

[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 metYX</i> (Lm)	4,1	6,2

- 35 Para aumentar el flujo de productos directos a metionina, se pueden usar un *metY* y un *metX* que son resistentes a inhibición por retroalimentación. También es posible regular el nivel de expresión de *metX* y el nivel de 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 muy eficaz en *E. coli* y que la ruta de *metXY* añadida a una cepa desregulada tal como esta puede producir más del doble de acumulación de metionina.

40

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

- 45 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 S-adenosil L-metionina.

La actividad enzimática se analizó según Yamagata, *Methods in Enzymology*, 143:478, 1987. El método se modificó ligeramente en que se tomaron múltiples puntos de muestras, se usó guanidina para extinguir la reacción y la formación de homocisteína se detectó usando DTNB (ácido (5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) Sigma D8130) como en el análisis para *metA* descrito en el ejemplo 3.B. Se definió una unidad enzimática (U) como la formación de un μmol de homocisteína por minuto a temperatura ambiente.

Se expresó y analizó MetY de *P. aeruginosa* usando 17,5 μg de proteína purificada (etiquetada en N). En contraste con *metY* de *L. meyeri* y la mayoría de otras homocisteína sintetas publicadas, esta enzima era activa tanto con acetil como succinil-homoserina. La actividad era similar para ambos sustratos, se inhibía por retroalimentación por metionina y SAMe y el nivel de inhibición por retroalimentación parecía ser ligeramente menor cuando OSHS era el sustrato. Se observó algo de inhibición a metionina 1 mM. Con OAHs como sustrato, a 10, 50 y 100 mM la enzima retuvo 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 aproximadamente el 72% y el 21% de la actividad original. Cuando OSHS era el sustrato la actividad caía al 53% y 31% en presencia de metionina 50 y 100 mM, y al 86% y 19% en presencia de SAMe 5 y 10 mM.

Ejemplo 3: Métodos de manipular genéticamente cepas huéspedes para aumentar la producción de metionina

Además de añadir rutas biosintéticas a organismos huéspedes como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1, el organismo huésped se puede manipular genéticamente además para disminuir la inhibición de rutas biosintéticas de metionina, aumentar la disponibilidad de reactivos, y/o disminuir el catabolismo del producto.

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

Un método para hacer una cepa de producción de metionina es modificar una cepa que ya se ha manipulado para producir un aminoácido, tal como treonina. Por ejemplo, se puede usar la cepa productora de treonina TF 4076 descrita en la publicación de patente coreana No. 92-8365 (KFCC 10718), incluso aunque sea un auxótrofo para metionina. Cepas 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, la producción de metionina se aumentó 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 biosintética de metionina. La cepa también se modificó para sobreexpresar el gen *metF*.

Delección de thrB

Se delecionó *thrB* usando un casete loxP-cloranfenicol (loxP-Cm) (Gene 2000 vol. 247, p255-264). El gen *thrB* se clonó por PCR usando las secuencias de cebadores 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; después 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 HL PCR (Bioneer Co, Corea). Los productos de PCR se eluyeron de gel y se clonaron en el kit de clonación pCR2.1-topo (Invitrogen, EE UU) y se nombró pCR-*thrB*. pCR-*thrB* se digirió usando pflMI y se insertó el casete loxP-Cm. De este plásmido, el gen *thrB* que contenía el casete loxP-Cm se amplificó por PCR usando los cebadores 1 y 2 (SEQ ID NO: 11 y 12). Los productos de PCR se purificaron por gel. Los fragmentos de PCR se electroporaron en la cepa TF4076 y se seleccionaron colonias resistentes a cloranfenicol y se confirmó la delección de *thrB*. El marcador cloranfenicol se eliminó de una colonia identificada y la cepa final obtenida se nombró TF4076B. Esta cepa no creció en medio mínimo M9 (DIFCO) sin treonina, lo que indica que esta cepa es un auxótrofo para 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 represor global de metionina gen *metJ*, se usó un método de delección en un paso FRT (Datsenko y Wanner *PNAS* 97:6640-6645, 2000). Se amplificaron fragmentos de PCR usando las secuencias de cebadores 3 y 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; y después 72°C durante 7 minutos, con premezcla HL PCR (Bioneer Co, Corea). Se seleccionaron colonias resistentes a cloranfenicol y se confirmó la delección del gen *metJ* usando las secuencias de PCR 5 y 6 (SEQ ID NO: 15 y 16). Usando la transformación del plásmido pCP20, el gen marcador cloranfenicol se eliminó y la eliminación se confirmó usando PCR. La cepa obtenida se nombró TF4076BJ.

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

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

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

5'-gtattccac gtcctcgggt taatcccatg atctccatat gaatattcctc cttag-3'

5. *metJ* SEQ ID NO: 15

5'-gggcttgtc ggtgaaatg-3'

10

6. *metJ* SEQ ID NO: 16

5'-actttgcat gagcgagag-3'

Integración *metF*

15

Para complementar la auxotrofia para metionina de TF4076BJ, el gen *metF* se expresó en la cepa TF4076BJ. El gen *metF* se amplificó usando las secuencias de cebadores 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 30 segundos; después 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos y 72°C 1 minuto; y después 72°C 7 minutos, con premezcla HL PCR (Bioneer Co, Corea). Los fragmentos de PCR se eluyeron de gel y se insertaron en los sitios *NheI* y *SacI* en el vector pSE380 (Invitrogen Co.). El plásmido se nombró pSE380-*metF*. pSE380-*metF* se transformó en la cepa TF4076BJ. El transformante creció en medio mínimo M9 (Difco) que contenía treonina e isoleucina lo que indica la complementación de la auxotrofia para metionina.

20

25

Se determinó el nivel de expresión del gen *metF* bajo el control de dos promotores diferentes. Los promotores eran el promotor pCJ1 (documento PCT/KR2005/004338) y el promotor pTreonina. El gen *metF* se amplificó usando las secuencias de cebadores 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 30 segundos; después 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos y 72°C 1 minuto; y después 72°C 7 minutos, con premezcla HL PCR (Bioneer Co, Corea). Los fragmentos de PCR se eluyeron de gel y se ligaron en los sitios *PvuII* y *HindIII* en el vector pCL1920 (Lerner e Inouye, *Nucleic acids Research* 18:4631, 1990) que contenía el promotor pCJ1 o el promotor pTreonina. El promotor pCJ1 se amplificó por PCR usando las secuencias de cebadores 11 y 12 (SEQ ID NO: 21 y 22) y el promotor pTreonina se amplificó del cromosoma de *E. coli* K12 usando las secuencias de cebadores 13 y 14 (SEQ ID NO: 23 y 24). Los fragmentos de PCR se eluyeron de gel y se integraron en los sitios *KpnI* y *EcoRV* en el vector pCL1920. Se usaron las mismas condiciones de PCR que las anteriores. El plásmido que contiene el gen *metF* bajo el control del promotor pCJ1 se nombró pCL-pCJ1-*metF* y el plásmido que contiene el gen *metF* bajo el control del promotor pTreonina se nombró pCL-pThr-*metF*. Cada plásmido se transformó en la cepa TF4076BJ y se midió la producción de metionina.

30

35

40

Se usó un protocolo de cultivo en matraz con agitación para probar las cepas como sigue: se incubó un cultivo semilla a 31°C durante 6 horas en medio que consistía en (en 1 litro): 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. Después se usó para inocular matraces con el siguiente medio (1 L): 17 g de (NH₄)₂SO₄, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 2 g de extracto de levadura, 0,3 g de L-treonina, 10 mg de MnSO₄·7H₂O, 10 mg de FeSO₄·7H₂O, 10 mg de ZnSO₄, 30 g de CaCO₃, 40 g de glucosa y 2 g de KH₂PO₄ pH 7,2. Los matraces se incubaron durante 64 a 72 horas a 31°C con agitación a 250 rpm. Después de centrifugar, el sobrenadante del cultivo se aisló y se usó para el análisis de metionina.

45

50

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

[Tabla 4]

Producción de metionina en células que contienen varios 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-MetF	7,4	35	206
TF4076BJ/pCL-pthr-MetF	22	40	136

55

Para expresar el gen *metF* más establemente, los genes *metF* bajo el control de los promotores pTrc, pCJ1 y pTreonina se integraron en el locus *lacZ* del cromosoma de TF4076BJ. Cada gen *metF* se amplificó por PCR de cada plásmido y se insertó en el sitio *NsiI* en el vector pBrint (Borgne et al., *Gene* 223:213-219, 1998). Los vectores se transformaron en la cepa TF4076BJ y se seleccionó un transformante que creció en medio que contenía cloranfenicol a 37°C y se confirmó la integración del gen *metF* en el locus *LacZ* del cromosoma. Las colonias seleccionadas se transformaron por pJW168 y el marcador de cloranfenicol se delecionó. Las células que contenían

60

el gen pCJ1-*metF* no se pudieron obtener y el transformante que contenía el casete pThr-*metF* no creció bien. Solo las células que contenían el gen pTrc-*metF* en el locus *LacZ* crecieron bien. El cultivo en matraz de esta cepa mostró producción de metionina de ~600 mg/l en presencia de IPTG 0,5 mM en el medio. La cepa final que contiene el gen pTrc-*metF* se nombró TF4076BJF y se analizó adicionalmente.

En resumen, la cepa TF4076BJF se derivó de la cepa productora de treonina TF 4076, que se modificó por la delección de *thrB* y *metJ*, y la inserción de *metF* bajo el control del promotor pTrc. La tabla 5 muestra la producción de homoserina y metionina por TF4076BJF.

[Tabla 5]
Producción de metionina de la cepa TF4076BJF

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

7. *metF* SEQ ID NO: 17
5'- GCT AGC c atgagcttttttcacgccag - 3'

8. *metF* SEQ ID NO: 18
5'- GAG CTC ttataaaccaggtcgaaccc - 3'

9. *metF* SEQ ID NO: 19
5'- CAGCTGatgagcttttttcacgccag- 3'

10. *metF* SEQ ID NO: 20
5'- AAGCTT ttataaaccaggtcgaaccc- 3'

11. promotor CJ1 SEQ ID NO: 21
5'- cgg ggt acc acc gcg ggc tta ttc cat tac at- 3'

12. promotor CJ1 SEQ ID NO: 22
5'- acg cga tat ctt aat ctc cta gat tgg gtt tc- 3'

13. promotor de treonina SEQ ID NO: 23
5'- cgg ggt acc tgg tta caa caa cgc ctg g- 3'

14. promotor de treonina SEQ ID NO: 24
5'- cat gat atc tac ctgc tta cc ttt ggt cg- 3'

La cepa TF4076BJF se hizo crecer en fermentadores de 5 litros según el protocolo descrito posteriormente, y se obtuvo una producción de aproximadamente 2,2 g/l de metionina en 96 horas.

Las fermentaciones de 5 litros se realizaron 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 básica para recipientes de 5 litros. El inóculo se hizo crecer 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 2,0 g/l de glucosa en volumen de 1 litro. Se usaron 50 mg/l del antibiótico apropiado dependiendo de la resistencia de la cepa que se ensaya. Después de incubación con agitación a 31°C y 250 rpm durante 8-24 horas, el cultivo se transfirió a 200 ml del mismo medio y se incubó en las mismas condiciones durante 16 a 20 horas. Este cultivo se usó para inocular fermentadores con 2,5 l de medio.

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

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

Se construyó una cepa de *E. coli* con los genes *metA* y *metB* delecionados. Esta cepa mostró acumulación de homoserina debido a la pérdida de actividad MetA. Cuando el casete *metA* de tipo salvaje se expresó en esta cepa, se produjo OSHS por la actividad MetA en ausencia de metionina. Sin embargo, cuando se añadió metionina en el medio, la cepa con el casete wt-*metA* acumuló homoserina de nuevo debido a la inhibición por retroalimentación de la actividad MetA. Por tanto, se pueden identificar genes *metA* resistentes a retroalimentación ensayando la acumulación de O-succinil homoserina en presencia de metionina. El mutante que produce más OSHS en presencia de alta cantidad de metionina en el medio contiene el *metA* más resistente a inhibición por retroalimentación.

Se proporciona una representación esquemática de la metodología de cribado en la figura 3.

Construcción del mutante de deleción de metB

Para hacer un mutante de deleción de *metB* en TF4076BJF, se usó el método de deleción en un paso FRT (Datsenko y Wanner *PNAS* 97:6640-6645, 2000). Se amplificaron fragmentos de PCR usando las secuencias de cebadores 15 y 16 (SEQ ID NO: 25 y 26) y el molde pKD3 se electroporó en células TF4076BJF. Se usaron las condiciones de PCR de 94°C 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, después 72°C 7 minutos y premezcla PCR HL (Corea, Bioneer Co). Se seleccionaron colonias resistentes a cloranfenicol y se confirmó la deleción del gen *metB* usando PCR. El gen marcador cloranfenicol se eliminó usando transformación del plásmido pCP20, y la eliminación se confirmó por PCR. La cepa obtenida por este procedimiento se nombró TF4076BJF-B.

15. *metB* + cloranfenicol SEQ ID NO: 25
5'-TTACTCTGGT GCCTGACATT TCACCGACA AAGCCAGGG AACTTCATCA Cgtgtaggct ggagctgctt c -3'

16. *metB* + cloranfenicol SEQ ID NO: 26
5'-TTACCCCTTG TTTGCAGCCC GGAAGCCATT TTCCAGGTCG GCAATTAAT Tcatatgaat atcctcctta g -3'

Construcción del mutante de deleción de metA

Para hacer un mutante de deleción de *metA* en TF4076BJF-B, se usó el método de deleción en un paso FRT (*PNAS* 97:6640-6645, 2000). Se amplificaron fragmentos de PCR usando las secuencias de cebadores 17, 18 (SEQ ID NO: 27 y 28) y el molde pKD3 se electroporó en células TF4076BJF-B. Se usaron las condiciones de PCR de 94°C 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, después 72°C 7 minutos y premezcla PCR HL (Corea, Bioneer Co). Se seleccionaron colonias resistentes a cloranfenicol y se confirmó la deleción del gen *metA* usando PCR. El gen marcador cloranfenicol se eliminó usando transformación del plásmido pCP20, y la eliminación se confirmó por PCR. La cepa obtenida por este procedimiento se nombró TF4076BJF-BA.

17. *metA* + cloranfenicol SEQ ID NO: 27
5 - CAATTTCTTGCGTGAAGAAAACGTCTTTGTGATGACAACCTTCTCGT GCGTggtgtaggctggagctgcttcc -3'

18. *metA* + cloranfenicol SEQ ID NO: 28
5' - AATCCAGCGTTGGATTGATGCGGCTAGATCGTATGGCGTGATCTG GTAGcatatgaatatcctccttag-3'

Construcción de un vector de expresión de metA

Para hacer una biblioteca de *metA*, se construyó un vector de expresión de *metA*. El gen *metA* se amplificó usando las secuencias de cebadores 19 y 20 (SEQ ID NO: 29 y 30) con el cromosoma de la cepa de *E. coli* K12 como el molde. Se usaron las condiciones de PCR de 94°C 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, después 72°C 7 minutos y premezcla PCR HL (Corea, Bioneer Co). Los fragmentos de PCR se eluyeron de gel y se ligaron en pCL1920 en el sitio *SmaI*. El plásmido se nombró pA-CL. El plásmido pA-CL se transformó en la cepa TF4076BJF-BA y se realizó cultivo en matraz con y sin metionina. Se midieron OSHS y homoserina por el mismo método descrito anteriormente para metionina. Como se muestra en la tabla 6, las células que contenían el plásmido pA-CL en ausencia de metionina produjeron 3,8 g/l de OSHS con 0,24 g/l de homoserina. Sin embargo, en presencia de metionina 1 g/l las células produjeron 5,8 g/l de OSHS con 4,9 g/l de homoserina. El aumento de la cantidad de OSHS se debe al aumento del crecimiento por adición de metionina, mientras que el aumento de homoserina se debe a la inhibición por retroalimentación de la actividad *metA* por metionina.

[Tabla 6]
Producción de O-succinil homoserina y homoserina en la cepa TF4076BJF-AB que contiene el plásmido pA-CL

Adición de metionina	Cepa	DO	Glucosa usada (g/l)	Producción de OSH (g/l)	Producción de HS (g/l)
0 g/l	TF4076BJF-AB/pCI1920	2,2	14,2	0	1,42
0 g/l	TF4076BJF-AB/pA-CL	2,1	13,1	3,8	0,24
1 g/l	TF4076BJF-AB/pCI1920	4,7	39,8	0	5,7

1 g/l	TF4076BJF-AB/pA-CL	6,4	37,4	5,9	4,9
-------	--------------------	-----	------	-----	-----

19. *metA* SEQ ID NO: 29
5'-aatgatccTGCCGTGAGCGGCGAATAC-3'

5 20. *metA* SEQ ID NO: 30
5' -agctctagaCTGCTGAGGTACGTTTCGG-3'

Construcción de una biblioteca mutante de pA-CL

10 Para hacer una biblioteca mutante de pA-CL, se realizó PCR propensa a errores. La PCR propensa a errores se hizo usando las secuencias de cebadores 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 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 68°C 2 minutos, después 72°C durante 7 minutos y kit de mutagénesis de PCR diversificar de BD (BD, EE UU). Los fragmentos de PCR se digirieron con *Bam*HI y *Xba*I y se ligaron en pCL1920. La biblioteca se transformó en la cepa TF4076BJF-AB
15 y se recogieron ~30.000 transformantes para análisis adicional

21: pCL1920 SEQ ID NO: 31
5' -CGAAGTAATCGCAACATCCG-3'

20 22: pCL1920 SEQ ID NO: 32
5'-GTCTGCTATGTGGTGCTATC-3'

Preparación de extracto crudo de enzima MetB

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

Para la sobreexpresión de la enzima MetB, el gen *metB* amplificado por PCR de cromosoma de *E. coli* K12 se dirigió con *Bam*HI y *Hind*III y se clonó en el vector pCDF-Duet (Novagene, EE UU). Se realizó una reacción de PCR usando las secuencias de cebadores 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 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, después 72°C 7 minutos y premezcla HL (Bioneer, Corea). El plásmido que contenía el gen *metB* se transformó en *E. coli* usando una célula Tuner (Novagen, EE UU) y el transformante se hizo crecer durante la noche con medio LB que contenía espectinomicina 50 µg/ml. El cultivo de la noche se diluyó en medio LB que contenía espectinomicina 50 µg/ml y se incubó a 37°C hasta que alcanzó una DO a 600 nm de 0,6, punto en el que se añadió IPTG a una
35 concentración final de 0,2 mM y el cultivo se incubó durante 4 horas a 30°C. Las células se recogieron por centrifugación a 12.000 rpm, se resuspendieron en tampón fosfato de potasio 0,1 M (pH 7,5) y se rompieron por sonicación (5 x 30 segundos). Se obtuvo un extracto celular crudo por centrifugación durante 20 minutos a 12.000 rpm y el sobrenadante se usó después para ensayo enzimático.

45 23: *metB* SEQ ID NO: 33
5' -gccagatccgATGACGCGTAAACAGGCCAC-3'

50 24: *metB* SEQ ID NO: 34
5'-ccgcaagcttTTACCCCTTGTTCAGCC-3'

Cribado de metA resistente a retroalimentación

Se identificaron mutaciones en *metA* resistentes a retroalimentación inoculando la cepa TF4076BJF-AB que contenía mutantes pA-CL en placas de 96 pocillos que contenían medio de microfermentación y cultivando durante
55 48 horas a 31°C con agitación. El medio de microfermentación es 1 volumen de medio del matraz de agitación 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.

Las placas de 96 pocillos se centrifugaron después durante 10 min a 3.000 rpm y se midió OSHS en el sobrenadante por el método enzimático descrito anteriormente (Preparación de extracto crudo de MetB). Se mezclaron 50 µl del sobrenadante del 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 de PLP (piridoxal 5'-fosfato hidrato, Sigma P9255) 10 mM + 1/100 de extracto crudo de MetB (5 mg/ml)). La reacción se incubó 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 o 2 colonias que mostraban la menor absorbancia a 415 nm de cada placa de 96 pocillos y se sembraron por estrías
60 en medio LB que contenía espectinomicina 50 µg/ml. Las colonias resultantes se inocularon en otra placa de 96
65

pocillos que contenía medio de microfermentación y se realizó una segunda ronda de cribado. Las cepas seleccionadas se ensayaron después en las condiciones de cultivos en matraz con agitación descritas anteriormente, con la adición de metionina 5 g/l al medio, y se midió la producción de O-succinilhomoserina.

- 5 Se seleccionaron 24 mutantes de 12.000 colonias para cultivo en matraz y 14 mutantes se seleccionaron para secuenciación. De esos, se identificaron 5 nuevos mutantes. Los otros 9 mutantes restantes poseían las mismas mutaciones que se habían descrito previamente. La acumulación de O-SHS y homoserina en cultivos en matraz con agitación para los 14 mutantes se muestra en la tabla 7, y los cambios de aminoácidos en las secuencias de *metA* de los mutantes seleccionados se muestran en la tabla 8.

10

[Tabla 7]
Resultados de cultivo en matraz de mutantes seleccionados

Cepa No.	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
#7	4,9	40	9,2	2,9
#8	4,6	40	5,4	3,8
#10	4,7	40	8,8	3,0
#11	4,7	40	9,1	2,8
#32	5,8	40	10,7	1,6
#34	5,6	40	10,1	2,4
#36	5,6	40	10,4	2,2
#37	5,9	40	9,6	1,6
#39	7,0	40	9,2	1,0
#22	4,8	40	9,4	1,4
#23	4,6	40	9,6	1,4
#41	5,6	40	11,8	2,1
#43	6,1	40	11,2	2,3
#47	6,0	40	11,2	2,2
#49	5,6	40	11,5	2,1

[Tabla 8]
Análisis de secuencia de mutantes seleccionados

15

posición	wt	32 SEQID NO: 2	37 SEQID NO: 4	10 SEQID NO: 6	11 SEQID NO: 8	41 SEQID 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 retroalimentación de metA mutante

- 20 Puesto que todos los *metA* resistentes a inhibición por retroalimentación produjeron cantidades similares de OSHS en presencia de metionina 5 g/l en el cultivo en matraz, se añadieron cantidades mayores de metionina en el medio de cultivo de matraz y se determinó la producción de OSHS. Después de 64 horas de cultivo con L-metionina 30 g/l, la producción de OSHS disminuyó solo en la muestra del mutante #37, y todos los otros mostraron niveles similares de producción de OSHS como en presencia de metionina 5 g/l. Estos resultados, presentados en la tabla 9, indicaban que los *metA* con resistencia a inhibición por retroalimentación eran resistentes a concentraciones tan
- 25 altas como metionina 30 g/l.

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

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

Caracterización in vitro de las proteínas metA mutantes

5 Se usó PCR para amplificar y después clonar los cinco genes mutantes de *metA* identificados como pCL-A#10, pCL-A#11, pCL-A#32, pCL-A#37, y pCL-A#41, en el vector pET30a. Todas las construcciones se sometieron a análisis de secuencia de ADN para confirmar la presencia de mutaciones. Los genes se clonaron con una etiqueta His C-terminal para la purificación de la enzima. Las enzimas se sobreexpresaron, se purificaron y la actividad se midió en presencia de diferentes niveles de metionina y SAME, como se describe por Lawrence, *J. Bacteriol.*, 109:8-11, 1972.

10 Las únicas modificaciones al 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 varios mutantes, y claramente muestra que todos los mutantes eran resistentes a inhibición por retroalimentación cuando se comparan con la enzima de tipo salvaje y que los mutantes #10 y #11 eran los más resistentes a inhibición tanto de metionina como de SAM.

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

Actividad específica (U/mg)*	w.t.	#10 SEQ ID NO: 6	#11 SEQ ID NO: 8	#32 SEQ ID NO: 2	#37 SEQ ID NO: 4	#41 SEQ ID NO: 10
control	386	176	479	276	228	315
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 actividad específica	w.t.	#10	#11	#32	#37	#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

* Donde U es la formación de 1 μ mol de CoA por minuto a temperatura ambiente.

20 Los mutantes *metA*#10 y *metA*#11 (SEQ ID NO: 5 y 7, respectivamente) se seleccionaron para análisis adicionales. Los mutantes de *metA* #10 y #11 se analizaron para su falta de inhibición en un experimento usando 300 mM de metionina. Esto está cerca a la mayor concentración alcanzable en las condiciones del ensayo. La solubilidad de metionina en agua es 5,6 g/100 ml a 30°C, que corresponde a una concentración de 375 mM. En presencia de 300 mM de metionina, el mutante *metA*#10 retuvo el 70% de su actividad específica, y el mutante *metA*#11 retuvo el 55% de su actividad específica. Por tanto, los mutantes *metA*#10 y #11 se pueden usar en un microorganismo productor de metionina.

25

Producción de metionina con metA resistente a inhibición por retroalimentación

30 *metA*#10 y *metA*#11 se clonaron individualmente en la cepa productora de metionina TF4076BJF. *MetA*#10 también se clonó junto con *metYX* de *L. meyeri*. Los clones se probaron según el protocolo de fermentación descrito en ejemplo 3A. Se evaluaron las concentraciones de metionina después de 78 horas de fermentación y los resultados se muestran en la tabla 11. No hubo acumulación de O-succinilhomoserina en ninguna de las fermentaciones. Las evoluciones temporales de la producción de metionina se muestran en la figura 4.

[Tabla 11]**Acumulación de metionina**

Cepa	Título final de metionina (g/l)
TF4076BJF	2,1
TF4076BJF <i>metA</i> #10	6,3

TF4076BJF metA#11	4,5
TF4076BJF metA#10 + metYX (Lm)	6,6

Estos resultados muestran que la expresión de *metA* resistentes a inhibición por retroalimentación aumentó la producción de metionina y que la combinación de una ruta de sulfhidrilación directa y una ruta metABC resistente a inhibición por retroalimentación mostró menos sinergismo que el observado con MetA nativa. El menor sinergismo observado indica que la acumulación de metionina puede estar inhibiendo MetY. Para aumentar más la producción de metionina, se puede usar un MetY resistente a inhibición por retroalimentación.

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

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

El aislamiento de mutantes en el gen *metK* está facilitado por la observación de que algunos mutantes resistentes a etionina tienen niveles reducidos de *metK* y sobreproducen metionina. La tabla 12 enumera varias mutaciones de *metK* que se han descrito como que producen una disminución en la actividad MetK. Estos mutantes se construyeron como se describe a continuación.

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

Los mutantes de MetK se purificaron (usando la etiqueta His C-terminal) y se ensayaron *in vitro*. La proteína MetK con etiqueta His C-terminal de tipo salvaje se usó como control. Los mutantes se ensayaron usando un ensayo radioactivo. Las condiciones del ensayo fueron como sigue:

Mezcla de ensayo:

1,0 ml de HEPES/KOH 0,5 M, pH 8,0
 0,5 ml de KCl 1,0 M
 0,2 ml de MgCl₂ 1,0 M
 1,0 ml de ATP (sal disódica, pH 8,0 con KOH) 100 mM
 0,1 ml de metionina 50 mM
 0,1 ml de [metil-¹⁴C]metionina NEN
 6,6 ml de H₂O
 EDTA 25 mM pH 8,0 parada para 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. La reacción se incubó a temperatura ambiente (o 25°C) durante un periodo deseado (de 1 a 10 minutos). La reacción se paró con la adición de 150 µl de EDTA 25 mM. Se echaron 100 µl de la reacción sobre un círculo de filtro de fosfocelulosa Whatman P-81 de 2,5 cm de diámetro (marcado con lapicero). Los filtros se lavaron con 3 L de agua destilada, se secaron al aire y se colocaron en viales de centelleo con acuasol. Las emisiones se contaron usando una ventana que se extiende de ¹⁴C hasta aproximadamente 0. Se determinaron la eficacia del ensayo y niveles de extinción añadiendo una cantidad conocida de cuentas de ¹⁴C-SAM pura y procesando a través del procedimiento entero. Los fondos son típicamente < 100 cpm (cuentas totales aprox. 10⁵ cpm por reacción).

[Tabla 12]

Actividad normalizada

Residuo	Posición	Sustituto	Efecto esperado en síntesis de SAME	Referencia	Actividad (CPM de SAME/ µg de enzima 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 actividad MetK	Markham comunicación personal	6,9
Cys	90	Ala	Solo el 10% de la actividad WT	J. Biol Chem. 1995	Igual al WT
Cys	90	Ser	Solo el 10% de la actividad WT	J. Biol Chem. 1995	23,2
Asp	118	Asn	Reducción de kcat de ~103	J. Biol Chem. 1999	1,3

			veces		
Val	185	Glu	Aumento 6,4X en Met excretada sobre el control	AEM 2005	4,9
Asp	238	Asn	Reducción de kcat de ~103 veces	J. Biol Chem. 1999	1,9
Cys	239/240	Ala*	Solo el 10% de la actividad WT	J. Biol Chem. 1995	Igual al WT
Lys	245	Met	Actividad 42.000 veces menor que WT	J. Biol Chem. 2000	2,5
Asp	271	Ala	Reducción de kcat de ~103 veces	J. Biol Chem. 1999	0,4 (sin duplicar)
WT control*		Ninguno		Cargill BioTDC	995,4
WT	Sin etiqueta	Ninguno		Laboratorio de Markham	5600

* WT control la proteína MetK también estaba etiquetada con His C-terminal para comparación con las proteínas *metK* mutantes etiquetadas. Se observó una disminución de aproximadamente 6 veces en actividad con la proteína MetK WT etiquetada cuando se comparó con la actividad de la proteína MetK sin etiquetar.

** - actividad para tiempo de reacción de 5 minutos descrita.

5 El producto de la reacción de MetK, SAMe, es un inhibidor no competitivo de MetK. Por tanto, las cinéticas de reacción son complicadas de analizar y se espera que la diferencia entre las actividades del tipo salvaje y los mutantes sea incluso mayor. Entender la actividad de las varias enzimas MatK mutantes se puede diseñar un huésped de producción adecuado.

10 D. Regulación del transportador de SAMe

S-AdenosilMet (SAMe) sirve como el principal donante de grupos metilo en todos los organismos, está implicada en la biosíntesis de poliaminas y es esencial para el crecimiento celular. La S-adenosiltransferasa (MetK, EC 2.5.1.6) cataliza la única ruta conocida para la biosíntesis de SAMe en *E. coli*, ya que este organismo no puede absorber SAMe del medio de crecimiento. Una alternativa a la disminución de *metK* como se ha descrito anteriormente es proporcionar a *E. coli* la capacidad de absorber SAMe y al mismo tiempo eliminar el gen *metK*, para reducir o evitar la utilización de metionina a través de esa ruta. El crecimiento celular se puede controlar después mediante la adición de SAMe al medio de fermentación.

20 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 SAMe tiene valores de K_T de 2-8 μM que es comparable a los valores para el transportador de *S. cerevisiae* (3,3 μM), *P. carinii* (4,5 μM), e hígado de rata (8,9 μM). Además, se ha descrito que el sistema de transporte de SAMe en *Rickettsia* puede complementar un mutante de delección de *metK* en *E. coli* (Driskell et al., *J. Bact.* 187:5719-5722, 2005).

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

E. Eliminación de transportadores de absorción de metionina para aumentar la metionina en el medio de fermentación

35 Se han identificado dos transportadores de metionina en *E. coli*, uno con una afinidad muy alta ($K_m = 0,1-0,13 \mu\text{M}$) y un segundo con menor afinidad ($K_m = 20-40 \mu\text{M}$). El locus para el sistema transportador de alta afinidad se designa *metD* ya que mutantes de *metD* son incapaces de transportar D-metionina y utilizarla 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 absorción de L-metionina y D-metionina. *metN* codifica la putativa ATPasa y *metI* codifica la región que atraviesa la membrana del transportador ABC *metD*. Se espera que el tercer componente, *metQ*, codifique el dominio de unión al sustrato. Puesto que los mutantes de delección de *metI*, *metN* y *metQ* aún pueden crecer en presencia de L-metionina, se toma que es evidencia indirecta de la presencia del sistema *metP* de baja afinidad.

45 Como se ilustra en la figura 5, *metD* importa D- y L-metionina, mientras que el transportador *metP* genéticamente no caracterizado importa solo L-metionina. MetD está representado 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), respectivamente. (Merlin et al., *J. Bacteriol.* 184: 5513-5517, 2002).

50 Se mostró que *metJ*, la proteína represora de metionina global, controla negativamente la expresión del operón que codifica el locus *metD*. La transcripción de los genes *metD* aumenta tras la carencia de metionina, que es un

correpresor de *metJ*. En células con una delección de *metJ*, los transportadores se expresan más y no están reprimidos por metionina (Merlin et al., *J. Bacteriol.* 184: 5513-5517, 2002). Las cepas de producción de metionina generalmente tienen secuencias *metJ* atenuadas o delecciones de *metJ* de modo que, para aumentar la producción, puede ser particularmente importante reducir la actividad importadora de metionina. Las cepas se pueden modificar eliminando el sistema de absorción de metionina *metD*. Esto prevendrá la absorción de metionina y evitará el potencial ciclo fútil de consumo de energía de absorción/excreción.

Eliminar *metD* produjo un aumento del 25% en la acumulación de metionina en el caldo de fermentación, medido por el protocolo de matraces con agitación descrito en el ejemplo 3, anteriormente.

F. Sobreexpresión de *methH*

El aumento en el flujo de carbono a través de la ruta de la metionina debido a las modificaciones en las cepas descritas aquí puede producir una acumulación de homocisteína dentro de la célula. La homocisteína es muy tóxica para la célula. Para evitar cualquier acumulación y convertir la homocisteína a metionina, es muy importante tener actividad homocisteína metilasa muy activa (EC 2.1.1.13 y 2.1.1.14) que están codificadas por *metE* y *methH*, respectivamente. Una manera de lograr esto es sobreexpresar estos genes bien en un sistema de plásmido o colocando la copia cromosómica bajo el control de un promotor fuerte.

El gen *methH* nativo de *E. coli* se sobreexpresó bajo diferentes promotores en una cepa que contiene las rutas duales *metABC* y *metXY*, y se midió la producción de metionina en el protocolo de matraz con agitación estándar. Los tres vectores usados para la sobreexpresión de *methH* fueron pCL-P(*cysK*), pCL-p(*pro*) y pCL-p(CJ-1) que se modificaron respectivamente a partir de plásmido pCL1920 comercialmente disponible sustituyendo el promotor Plac con el promotor del gen *cysK* de *E. coli*, el promotor del vector comercial pPROLar y el promotor propietario de CJ Corporation CJ1. La ORF del gen *methH* de *E. coli* se situó justo después de los promotores. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13, a continuación. Estaba claro que incluso a los niveles relativamente bajos de metionina acumulada en el protocolo de matraces con agitación, la presencia de una alta concentración de la homocisteína metilasa tuvo un efecto positivo muy significativo en la producción de metionina. El efecto era incluso más pronunciado en fermentadores.

[Tabla 13]

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

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

G. Mejora de la absorción de sulfato y aumento del conjunto de APS en organismos productores de metionina

Este ejemplo describe un método de manipular *E. coli* para evitar el intermedio, PAPS, en su ruta de asimilación de azufre endógena. La nueva ruta creada requiere una molécula menos de ATP para cada molécula de sulfato reducida a sulfuro, por tanto, es más eficaz en energía (véase, la figura 6).

Como se ha descrito previamente, la figura 6 muestra dos rutas para tomar ventaja de rutas de asimilación de azufre alternativas. Una manera es clonar el gen de la adenilil sulfato reductasa, *cysH* (EC 1.8.4.9) de *Bacillus* o *P. aeruginosa* y bien incorporarlo en el genoma de *E. coli* o expresarlo de un plásmido. Esto permite que APS se convierta a sulfito en un único paso, evitando así la conversión de APS a PAPS catalizada por la APS quinasa de *E. coli* (*cysC*). La segunda manera sería mutar el gen de PAPS reductasa de *E. coli*, basado en los homólogos bacterianos de *cysH*, de modo que su especificidad de sustrato cambie de PAPS a APS.

Los genes *cysH* de *Bacillus subtilis* 168 (número de acceso REGIÓN AJ000974: 548.1249) y *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Número de acceso REGIÓN NC_002516: 1895692..1896495) se clonaron en plásmidos y se probaron para determinar si podrían complementar mutantes de eliminación de *cysC* o *cysH* en *E. coli*, que son auxótrofos tanto para cisteína como metionina.

Brevemente, los genes *cysH* de *Bacillus subtilis* 168 y *Pseudomonas aeruginosa* PA01 se transformaron en BL21(DE3) Δ *cysH*, una eliminación de *cysH* de BL21(DE3), para probar para complementación. Se usaron colonias

individuales de las siguientes cuatro cepas para inocular cultivos de 5 ml que contenían el medio Overnight Express (OnEX: medio definido suplementado con aminoácidos, pero no cisteína o metionina) de Novagen.

- 5 Se incubaron cultivos durante 48 horas a 30°C con agitación constante. Los resultados, presentados en la tabla 14, indican que el gen *cysH* tanto de *B. subtilis* como *P. aeruginosa* fueron capaces de complementar la eliminación de *cysH* en *E. coli* sostener el crecimiento.

[Tabla 14]

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

Cepa	DO ₆₀₀
BL21(DE3) (cepa de tipo salvaje)	5,2
BL21(DE3) Δ cysH (con delección de <i>cysH</i>)	0
BL21(DE3) Δ cysH + pET23BscysH (adición de <i>cysH</i> de <i>Bacillus</i>)	7,2
BL21(DE3) Δ cysH + pET23PacysH (adición de <i>cysH</i> de <i>Pseudomonas</i>)	6,8

- 10 Similarmente, se usó una cepa que tenía el gen *cysC* eliminado para probar la complementación por los genes *cysH* de *B. subtilis* y *P. aeruginosa*. La cepa BL21(DE3) Δ cysC se transformó 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.
- 15 Las células se cultivaron a 37°C con agitación durante 48 horas y el crecimiento se midió a DO_{600nm}. Los resultados, mostrados en la tabla 15, indicaban que la APS reductasa codificada por *cysH* tanto de *B. subtilis* como *P. aeruginosa* pudieron complementar la mutación de *cysC* en BL21(DE3) lo que demuestra que era posible evitar la formación de PAPS.

20 **[Tabla 15]**

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

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

^a Los resultados con la media de tres cultivos.

Sobreexpresión de enzimas en la ruta de asimilación de azufre

- 25 Como se ha descrito 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 acilhomoserina, la disponibilidad de SH₂ es esencial. Todos los genes principales de la ruta de asimilación de azufre se clonaron y sobreexpresaron en la cepa de producción de metionina TF4076BJF. Los genes sobreexpresados fueron:

- 30 *cys PUWA*: sulfato permeasa
cysDN: ATP sulfurilasa (EC 2.7.7.4)
CysCCysH: APS quinasa y PAPS sulfotransferasa (EC 2.7.1.25 y EC 1.8.4.8)
CysJcysG: NADPH-sulfito reductasa (EC 1.8.1.2)
- 35 *CysB*: activador de transcripción

- Estos genes se sobreexpresaron en una cepa que contenía las rutas duales *metABC* y *metXY*, y se midió la producción de metionina en el protocolo de matraz con agitación estándar. Los cinco grupos de genes de asimilación de azufre anteriormente mencionados se clonaron respectivamente en el vector pCL-(Prmf) que se construyó sustituyendo el promotor Plac del plásmido pCL1920 con 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 varias enzimas de la ruta de asimilación de azufre

Cepas	DO	Met mg/l	Met/DO
TF4076BJF <i>met YX</i> (Lm)	8,0	934	116
TF4076BJF <i>met YX</i> (Lm) <i>cys PUWA</i>	4,2	206	49
TF4076BJF <i>met YX</i> (Lm) <i>cysDN</i>	10,3	1271	123
TF4076BJF <i>met YX</i> (Lm) <i>cysCcysH</i>	9,9	1348	136
TF4076BJF <i>met YX</i> (Lm) <i>cysJcysG</i>	7,7	1038	134
TF4076BJF <i>met YX</i> (Lm) <i>cysB</i>	9,4	425	45

- 45 La sobreexpresión de las enzimas de transporte, así como del regulador de transcripción resultó en menor producción de metionina y una caída significativa en la cantidad de metionina por unidad de masa celular. Aumentar

la actividad de la sulfurilasa, la APS quinasa y la sulfotransferasa, resultó en producción de metionina aumentada por unidad de células, así como metionina total producida. Dado que estos aumentos se observan en una cepa que tiene dos plásmidos diferentes, se puede esperar que los resultados mejoren mucho más una vez que la expresión de las enzimas se ajuste y optimice.

5

Ejemplo 4: Cepas de producción de metionina ejemplares

Como se ha descrito previamente, las varias modificaciones genéticas descritas en el presente documento se pueden hacer mediante la incorporación de secuencias de ADN recombinante independientes del cromosoma, o las secuencias de ADN recombinante se pueden incorporar en el cromosoma de la cepa de producción. Las secuencias de ADN recombinante se pueden incorporar en las células huéspedes como una única copia o en múltiples copias.

10

i) Un microorganismo, tal como *E. coli* ATCC # 13070 o TF4076, se manipula para contener una delección funcional de *thrB* y *metJ* de modo que los genes están atenuados. Este microorganismo expresa los genes *metX* y *metY*, así como una secuencia de ácido nucleico recombinante que produce 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 produce un flujo aumentado de homocisteína a metionina.

15

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

20

iii) Aún se crea otra cepa de producción haciendo las siguientes modificaciones al microorganismo descrito en i). El microorganismo descrito en i), se modifica además para sustituir el gen *metA* nativo con un gen *metA* resistente a inhibición por retroalimentación, tal como los descritos en el ejemplo 3.

25

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

v) Se crea otra cepa de producción haciendo las siguientes modificaciones al microorganismo descrito en i). El microorganismo descrito en i) que sobreexpresa el producto del gen *metF* se modifica adicionalmente para atenuar el represor transcripcional gen *lacl*.

30

vi) Se crean cepas de producción adicionales haciendo las siguientes modificaciones a las cepas descritas en el presente documento. Las cepas de producción se manipulan 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 sustituir los *cysC* y *cysH* nativos de *E. coli* con un único gen *cysH* de *P. aeruginosa* o *B. subtilis*.

35

vii) Se hace otra cepa de producción modificando cualquiera de las cepas de producción descritas en el presente documento de modo que el gen importador de metionina *metD* esté atenuado.

40

Se muestran aspectos y características de la presente divulgación en las siguientes cláusulas numeradas que contienen el objeto de las cláusulas de solicitud parental como se presentó.

45

1. Un organismo que comprende:

uno o más primeros péptidos que comprenden actividad de sulfhidrilación directa (EC 2.5.1.49 y 4.2.99.-), en donde la actividad de sulfhidrilación directa usa un sustrato OSHS u OAHS; y

50

uno o más segundos péptidos que comprenden actividad de transulfuración (EC 2.5.1.48 y 4.4.1.8), en donde la actividad de sulfhidrilación directa consiste en la expresión de una secuencia de ácido nucleico exógena.

2. El microorganismo de la cláusula 1, en donde el microorganismo es *E. coli*.

55

3. El microorganismo de la cláusula 1, que comprende además una cantidad detectable de metionina.

4. El microorganismo de la cláusula 1, que comprende además una cantidad detectable de SAME.

5. El microorganismo de la cláusula 3, en donde al menos el 10% de la metionina producida es de actividad de transulfuración.

60

6. El microorganismo de la cláusula 4, en donde al menos el 10% de la SAME producida es de actividad de transulfuración.

65

7. El microorganismo de la cláusula 3, en donde al menos el 10% de la metionina producida es de actividad de sulfhidrilación directa.
- 5 8. El microorganismo de la cláusula 4, en donde al menos el 10% de la SAME producida es de actividad de sulfhidrilación directa.
9. El microorganismo de la cláusula 1, que comprende además un péptido homoserina O-succiniltransferasa que es resistente a retroalimentación.
- 10 10. El microorganismo de la cláusula 1, que comprende además un péptido homoserina O-succiniltransferasa con No. de acceso en GenBank: AAC76983 que tiene mutaciones en la posición de aminoácido 24, 29, 79, 114, 140, 163, 222, 275, 290, 295, 297, 304, 305 o combinaciones de las mismas.
- 15 11. El microorganismo de la cláusula 1, que comprende además un péptido homoserina O-succiniltransferasa que comprende SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, o 10.
12. El microorganismo de la cláusula 1, que comprende además una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica una *adenilil sulfato reductasa* (EC 1.8.99.2).
- 20 13. El microorganismo de la cláusula 1, en donde al menos un gen seleccionado de *metD*, *metK*, *metJ*, *thrB*, *serA*, o combinaciones de los mismos está atenuado.
- 25 14. El microorganismo de la cláusula 1, en donde al menos un gen seleccionado de *metA*, *metB*, *metC*, *metE*, *metY*, *metZ*, *metX*, *metH*, *cysPWUA*, *cysD*, *cysN*, *cysC*, *cysH*, *cysl*, *cysJ*, *cysG*, *csyK*, *cysM*, y combinaciones de los mismos, está sobreexpresado.
15. Un método de hacer metionina que comprende:
 cultivar el microorganismo de la cláusula 1 en condiciones que permiten la producción de metionina; y
 30 aislar la metionina.
16. El método de la cláusula 15, en donde el primer péptido que tiene actividad de sulfhidrilación directa está codificado por *metZ*, *metY* o combinaciones de los mismos.
- 35 17. El método de la cláusula 15, en donde el microorganismo es *E. coli*.
18. El método de la cláusula 16, en donde al menos el 10% de la metionina está producida por el primer péptido y en donde el primer péptido está codificado por *metZ*, *metY* o combinaciones de los mismos.
- 40 19. El método de la cláusula 15, en donde al menos el 10% de la metionina está producida por el segundo péptido y en donde el segundo péptido está codificado por *metB*, *metC* o combinaciones de los mismos.
20. El método de la cláusula 15, en donde la actividad de transsulfuración endógena esta codificada por *metB*,
 45 *metC* o combinaciones de los mismos.
21. El método de la cláusula 1, en donde al menos el 10% de la metionina producida está producida por el primer péptido y en donde el primer péptido está codificado por un gen *metZ*.
22. El microorganismo de la cláusula 1, en donde el primer péptido es un péptido MetX que comprende una
 50 secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia a los números de acceso CAA71733, ZP_00766367 o ZP_00107218.
23. El microorganismo de la cláusula 1, en donde el primer péptido es un péptido MetX que comprende una
 55 secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia a los números de acceso CAA71733, ZP_00766367 o ZP_00107218.
24. El método de la cláusula 15, en donde el primer péptido es un péptido MetY que comprende una secuencia de
 60 aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia a los números de acceso AAG08410, CAA71732, ZP_00766366 o ZP_00107219.
25. El método de la cláusula 15, en donde el primer péptido es un péptido MetY que comprende una secuencia de
 65 aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia a los números de acceso AAG08410, CAA71732, ZP_00766366 o ZP_00107219.
26. El método de la cláusula 15, en donde el segundo péptido es un péptido MetZ que tiene una secuencia de
 aminoácidos que comprende al menos el 70% de identidad de secuencia con el número de acceso AAG06495.

27. El método de la cláusula 15, en donde el segundo péptido es un péptido MetZ que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el 90% de identidad de secuencia con el número de acceso AAG06495.
- 5 28. El método de la cláusula 15, en donde el microorganismo comprende además un gen atenuado seleccionado de *metD*, *metK*, *metJ*, *thrB*, *serA*, o combinaciones de los mismos.
29. El método de la cláusula 15, en donde el microorganismo comprende además secuencias de ácido nucleico genéticamente manipuladas adicionales que producen una cepa de producción genéticamente manipulada, y en donde la cepa de producción genéticamente manipulada produce el 10% más de metionina comparada con el microorganismo sin tales cambios.
- 10 30. El método de la cláusula 29, en donde la cepa de producción genéticamente manipulada incluye una modificación genética para disminuir el catabolismo del producto, aumentar la disponibilidad de reactivos, disminuir la inhibición de la ruta biosintética de metionina o combinaciones de las mismas.
- 15 31. Una *E. coli* aislada que comprende una cistationina gamma sintasa (EC 2.5.1.48) u O-succinil homoserina sulfhidrilasa (EC 4.2.99.-) y una homocisteína sintasa (EC 2.5.1.49) expresadas de una secuencia de ácido nucleicos exógena.
- 20 32. La *E. coli* aislada de la cláusula 31, que comprende una cistationina gamma sintasa (EC 2.5.1.48) expresada de una secuencia de ácido nucleico endógena y una homocisteína sintasa (EC 2.5.1.49) expresadas de una secuencia de ácido nucleicos exógena.
- 25 33. La *E. coli* aislada de la cláusula 32, que comprende además homoserina O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31).
34. La *E. coli* aislada de la cláusula 31, en donde la secuencia de ácido nucleico exógena comparte al menos el 70% de identidad de secuencia con un número de acceso seleccionado de los números de acceso AE004091, REGIÓN AE004091: 5655648..5656925, REGIÓN Y10744: 1485..2813, REGIÓN NZ_AA000004: 164536..165990 y REGIÓN NZ_AAAY02000081: complemento(12750..14054).
- 30 35. La *E. coli* aislada de la cláusula 31, en donde la secuencia de ácido nucleico exógena comparte al menos el 90% de identidad de secuencia con un número de acceso seleccionado de los números de acceso AE004091, REGIÓN AE004091: 5655648..5656925, REGIÓN Y10744: 1485..2813, REGIÓN NZ_AA000004: 164536..165990 y REGIÓN NZ_AAAY02000081: complemento(12750..14054).
- 35 36. La *E. coli* aislada de la cláusula 31, en donde la secuencia de ácido nucleico exógena se selecciona de los números de acceso AE004091, REGIÓN AE004091: 5655648..5656925, REGIÓN Y10744: 1485..2813, REGIÓN NZ_AA000004: 164536..165990 y REGIÓN NZ_AAAY02000081: complemento(12750..14054).
- 40 37. La *E. coli* aislada de la cláusula 31, que comprende además una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica una adenilil sulfato reductasa (EC 1.8.99.2).
- 45 38. Un método de hacer metionina, que comprende cultivar un microorganismo aislado que comprende una molécula de ADN recombinante, en donde la molécula de ADN recombinante sobreexpresa adenilil sulfato reductasa (EC 1.8.99.2) en condiciones suficientes para producir metionina; y aislar la metionina.
- 50 39. El método de la cláusula 38, en donde el microorganismo es *E. coli*.
40. El método de la cláusula 38, en donde el microorganismo comprende un gen que codifica *metX*, *metY*, *metB*, *metC*, *metZ*, y combinaciones de los mismos.
- 55 41. El método de la cláusula 40, en donde el gen es endógeno.
42. El método de la cláusula 40, en donde el gen es exógeno.
- 60 43. Un péptido aislado que comprende un péptido codificado por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, o 9, en donde el péptido comprende actividad homoserina O-succiniltransferasa.

Lista de secuencias

65 <110> Cargill, Incorporated
CJ Corporation

ES 2 575 906 T3

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE PRODUCIR METIONINA

<130> P48357EP3/TCL

5

<150> EP07775377.0

<151> 11-04-2007

<160> 34

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 930

15

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 1

```
atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc 60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccgcttaa ggttctgac 120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac 180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240
cccgagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgtg ggctgtgtg agtttaatga tgcgcttac 360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtt 420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgtcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
accgaacaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggctgcg 600
ttgattcgtg attacaccga tctggaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660
ctgtagcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg 780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840
ggtaatttac tgttaccaa ctggctcaac tattacgtct accggatcac gccatagat 900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa 930
```

20

<210> 2

<211> 309

<212> PRT

<213> Escherichia coli

25

<400> 2

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

ES 2 575 906 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					80				
Pro	Ala	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Cys	Asn	Phe	Glu	Asp	Ile	Gln				
				85					90					95					
Asp	Gln	Asn	Phe	Asp	Gly	Leu	Ile	Val	Thr	Gly	Ala	Pro	Leu	Gly	Leu				
			100					105						110					
Val	Glu	Phe	Asn	Asp	Val	Ala	Tyr	Trp	Pro	Gln	Ile	Lys	Gln	Val	Leu				
		115					120					125							
Glu	Trp	Ser	Lys	Asp	His	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Phe	Val	Cys	Trp	Ala				
	130					135					140								
Val	Gln	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ile	Pro	Lys	Gln	Thr	Arg				
145					150					155					160				
Thr	Glu	Gln	Leu	Ser	Gly	Val	Tyr	Glu	His	His	Ile	Leu	His	Pro	His				
				165					170						175				
Ala	Leu	Leu	Thr	Arg	Gly	Phe	Asp	Asp	Ser	Phe	Leu	Ala	Pro	His	Ser				
			180					185						190					
Arg	Tyr	Ala	Asp	Phe	Pro	Ala	Ala	Leu	Ile	Arg	Asp	Tyr	Thr	Asp	Leu				
		195					200					205							
Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ser				
	210					215					220								
Lys	Asp	Lys	Arg	Ile	Ala	Phe	Val	Thr	Gly	His	Pro	Glu	Tyr	Asp	Ala				
225					230					235					240				
Gln	Thr	Leu	Ala	Gln	Glu	Phe	Phe	Arg	Asp	Val	Glu	Ala	Gly	Leu	Asp				
				245					250					255					

ES 2 575 906 T3

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 tcttgctga agaaaacgtc 60
 tttgtgatgt caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc 120
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcctcgatt ctctggaatc gcgcaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgcccgtg ggcctggtgg agtttaatga tctcgtctac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420
 gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660
 ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg 780
 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagagagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcgc gccatagcat 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					80							
Pro	Ala	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Cys	Asn	Phe	Glu	Asp	Ile	Gln							
				85					90					95								
Asp	Gln	Asn	Phe	Asp	Gly	Leu	Ile	Val	Thr	Gly	Ala	Pro	Leu	Gly	Leu							
			100					105					110									
Val	Glu	Phe	Asn	Asp	Val	Ala	Tyr	Trp	Pro	Gln	Ile	Lys	Gln	Val	Leu							
		115					120					125										
Glu	Trp	Ser	Lys	Asp	His	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Phe	Val	Cys	Trp	Ala							
130						135					140											
Val	Gln	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ile	Pro	Lys	Gln	Thr	Arg							
145					150					155					160							
Thr	Glu	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Tyr	Glu	His	His	Ile	Leu	His	Pro	His							
				165					170					175								
Ala	Leu	Leu	Thr	Arg	Gly	Phe	Asp	Asp	Ser	Phe	Leu	Ala	Pro	His	Ser							
			180					185					190									
Arg	Tyr	Ala	Asp	Phe	Pro	Ala	Ala	Leu	Ile	Arg	Asp	Tyr	Thr	Asp	Leu							
		195					200					205										
Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Tyr	Leu	Phe	Ala	Ser							
210						215					220											
Lys	Asp	Lys	Arg	Ile	Ala	Phe	Val	Thr	Gly	His	Pro	Glu	Tyr	Asp	Ala							
225					230					235					240							
Gln	Thr	Leu	Ala	Gln	Glu	Phe	Phe	Arg	Asp	Val	Glu	Ala	Gly	Leu	Asp							
				245					250					255								

ES 2 575 906 T3

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
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<400> 5
 atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctgga agaaaacgtc 60
 tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc 120
 cttaacctga tgcogaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacogatt cccgtgaatc ggcgaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcttgggg agtttaatga tgcgcttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420
 gtctgctggg cggtagcaggc cgcgctcaac atcctctaog gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcogctt atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660
 ctggttgcca gtaaagataa ggcatttgc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgog 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccg 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 2 575 906 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					80
Pro	Ala	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Cys	Asn	Phe	Glu	Asp	Ile	Gln
				85					90					95	
Asp	Gln	Asn	Phe	Asp	Gly	Leu	Ile	Val	Thr	Gly	Ala	Pro	Leu	Gly	Leu
			100					105					110		
Val	Glu	Phe	Asn	Asp	Val	Ala	Tyr	Trp	Pro	Gln	Ile	Lys	Gln	Val	Leu
		115					120					125			
Glu	Trp	Ser	Lys	Asp	His	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Phe	Val	Cys	Trp	Ala
	130					135					140				
Val	Gln	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ile	Pro	Lys	Gln	Thr	Arg
145					150					155					160
Thr	Glu	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Tyr	Glu	His	His	Ile	Leu	His	Pro	His
				165					170					175	
Ala	Leu	Leu	Thr	Arg	Gly	Phe	Asp	Asp	Ser	Phe	Leu	Ala	Pro	His	Ser
			180					185					190		
Arg	Tyr	Ala	Asp	Phe	Pro	Ala	Ala	Leu	Ile	Arg	Asp	Tyr	Thr	Asp	Leu
		195					200					205			
Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Tyr	Leu	Phe	Ala	Ser
	210					215					220				
Lys	Asp	Lys	Arg	Ile	Ala	Phe	Val	Thr	Gly	His	Pro	Glu	Tyr	Asp	Ala
225					230					235					240
Gln	Thr	Leu	Ala	Gln	Glu	Phe	Phe	Arg	Asp	Val	Glu	Ala	Gly	Leu	Asp
				245					250					255	

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

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

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

Asn Pro Thr Leu Asp
 305

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

<400> 7
 atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctgga agaaaacgtc 60
 tttgtgatga caacttctcg tgcgcctggt caggaaattc gtccacttaa gtttctgatc 120
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgcct gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacatgatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggccctggtg ggtttaatga tgtegtttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtct 420
 gtctgctggg cggtagcaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660
 ctgtttgcca gtaaagataa ggcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg 780
 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gacgagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttaccas ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat 900
 ctacggcaca tgaaccaaac 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

ES 2 575 906 T3

1 5 10 15
 Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Pro Gly Gln Glu
 20 25 30
 Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile
 35 40 45
 Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln
 50 55 60
 Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr
 65 70 75 80
 Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln
 85 90 95
 Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
 100 105 110
 Val Gly Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
 115 120 125
 Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Ser Val Cys Trp Ala
 130 135 140
 Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
 145 150 155 160
 Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
 165 170 175
 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
 180 185 190
 Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
 195 200 205
 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
 210 215 220
 Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
 225 230 235 240
 Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
 245 250 255

ES 2 575 906 T3

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

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

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

Asn Pro Thr Leu Asp
 305

<210> 9
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<400> 9
 atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgtga agaaaacgtc 60
 tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc 120
 cttaacctga tgcogaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacgcatt cccgtgaatc gcgcagcacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggctgggtgg agtttaatga tgtcgcttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgatt 420
 gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaaaaac tctctggcgt ttaacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggccttg atgattcatt cctggcaccg cactcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgatctctg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggagaagg ggatgcatat 660
 ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagcgg gactagaccg ggatgtaccg 780
 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac aattacgtct accagatcac gccatagcat 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 2 575 906 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					80
Pro	Ala	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Cys	Asn	Phe	Glu	Asp	Ile	Gln
				85					90					95	
Asp	Gln	Asn	Phe	Asp	Gly	Leu	Ile	Val	Thr	Gly	Ala	Pro	Leu	Gly	Leu
			100					105					110		
Val	Glu	Phe	Asn	Asp	Val	Ala	Tyr	Trp	Pro	Gln	Ile	Lys	Gln	Val	Leu
		115					120					125			
Glu	Trp	Ser	Lys	Asp	His	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Ile	Val	Cys	Trp	Ala
	130					135					140				
Val	Gln	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ile	Pro	Lys	Gln	Thr	Arg
145					150					155					160
Thr	Glu	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Tyr	Glu	His	His	Ile	Leu	His	Pro	His
				165					170					175	
Ala	Leu	Leu	Thr	Arg	Gly	Phe	Asp	Asp	Ser	Phe	Leu	Ala	Pro	His	Ser
			180					185					190		
Arg	Tyr	Ala	Asp	Phe	Pro	Ala	Ala	Leu	Ile	Arg	Asp	Tyr	Thr	Asp	Leu
		195					200					205			
Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Tyr	Leu	Phe	Ala	Ser
	210					215					220				
Lys	Asp	Lys	Arg	Ile	Ala	Phe	Val	Thr	Gly	His	Pro	Glu	Tyr	Asp	Ala
225					230					235					240
Gln	Thr	Leu	Ala	Gln	Glu	Phe	Phe	Arg	Asp	Val	Glu	Ala	Gly	Leu	Asp
				245					250					255	

ES 2 575 906 T3

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

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

10 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 11
gctagccatg gttaaagttt atgccccg 28

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

20 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 12
gagctcttag tttccagta ctggtgcgc 29

25 <210> 13
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 13
atggctgaat ggagcggcga atatatcagc ccatacgcctg agcacggcaa ggtgtaggct 60

35 **ggagctgctt c** 71

40 <210> 14
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 14
gtattccac gtctccgggt taatcccat ctacgcctg atctccatat gaatacctc 60

45 **cttag** 65

<210> 15

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

5 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 15
gggctttgtc ggtgaaatg 19

10 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 16
actttgcat gagcgagag 19

20 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 17
gctagccatg agcttttttc acgccag 27

30 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 18
gagctcttat aaaccaggtc gaacco 26

40 <210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 19
cagctgatga gcttttttca cgccag 26

50 <210> 20
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 20
aagcttttat aaaccaggtc gaacco 26

<210> 21
 <211> 32
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 10 <400> 21
 cggggtacca cgcgggctt attcattac at 32

 <210> 22
 <211> 32
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 20 <400> 22
 acgggatatc ttaatctcct agattgggtt tc 32

 <210> 23
 <211> 28
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 30 <400> 23
 cggggtacct ggttacaaca acgcttgg 28

 <210> 24
 <211> 29
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 40 <400> 24
 catgatatct acctcgttac ctttggctg 29

 45 <210> 25
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 25
 ttactctggt goctgacatt tcacogacaa agcccagga acttcatcac gtgtaggctg 60

 55 gagctgcttc 70

 <210> 26
 <211> 69
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

	<400> 26		
	ttaccccttg tttgcagccc ggaagccatt ttccaggctg gcaattaaat catatgaata	60	
	tctctctta	69	
5	<210> 27 <211> 71 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> Cebador de PCR		
	<400> 27		
	caatttcttg cgtgaagaaa acgtctttgt gatgacaact tctcgtgcgt gtgtaggctg	60	
	gagctgcttc c	71	
15	<210> 28 <211> 70 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> Cebador de PCR		
	<400> 28		
	aatccagcgt tggattcatg tgccgtagat cgtatggcgt gatctggtag catatgaata	60	
25	tctctcttag	70	
30	<210> 29 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> Cebador de PCR		
35	<400> 29		
	aatggatcct gccgtgagcg gcgaatac	28	
40	<210> 30 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> Cebador de PCR		
45	<400> 30		
	agctctagac tgctgagta cgtttcgg	28	
50	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> Cebador de PCR		
55	<400> 31		
	cgaagtaatc gcaacatccg	20	

ES 2 575 906 T3

<210> 32
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

10 <400> 32
gtctgctatg tggcgctatc 20

<210> 33
<211> 31
15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

20 <400> 33
gccaggatcc gatgacgcgt aaacaggcca c 31

<210> 34
<211> 30
25 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

30 <400> 34
cgcgaagctt tttaccctt gttgcagcc 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado con actividad homoserina O-succiniltransferasa, que muestra una sensibilidad reducida a inhibición por retroalimentación por L-metionina comparado con un polipéptido homoserina O-succiniltransferasa de tipo salvaje derivado de *E. coli*, y que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
2. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el péptido aislado según la reivindicación 1.
- 10 3. La molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 2, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.
4. Un plásmido que comprende la molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 2.
- 15 5. Una cepa de microorganismo transformada con el plásmido según la reivindicación 4.
6. Un método de producir L-metionina que comprende:
20 cultivar el microorganismo según la reivindicación 5 en condiciones que permiten la producción de L-metionina; y
aislar la L-metionina así producida.

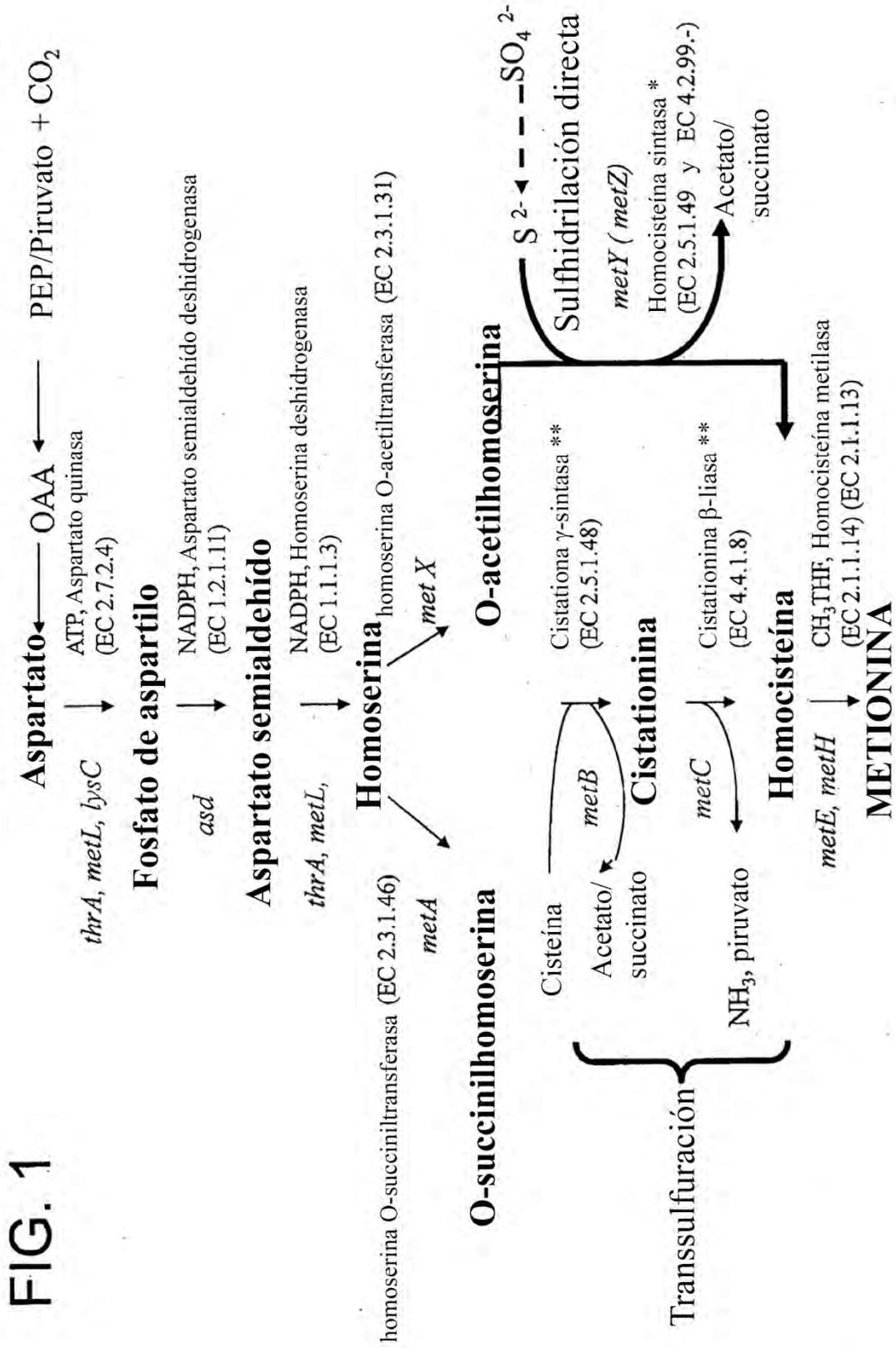
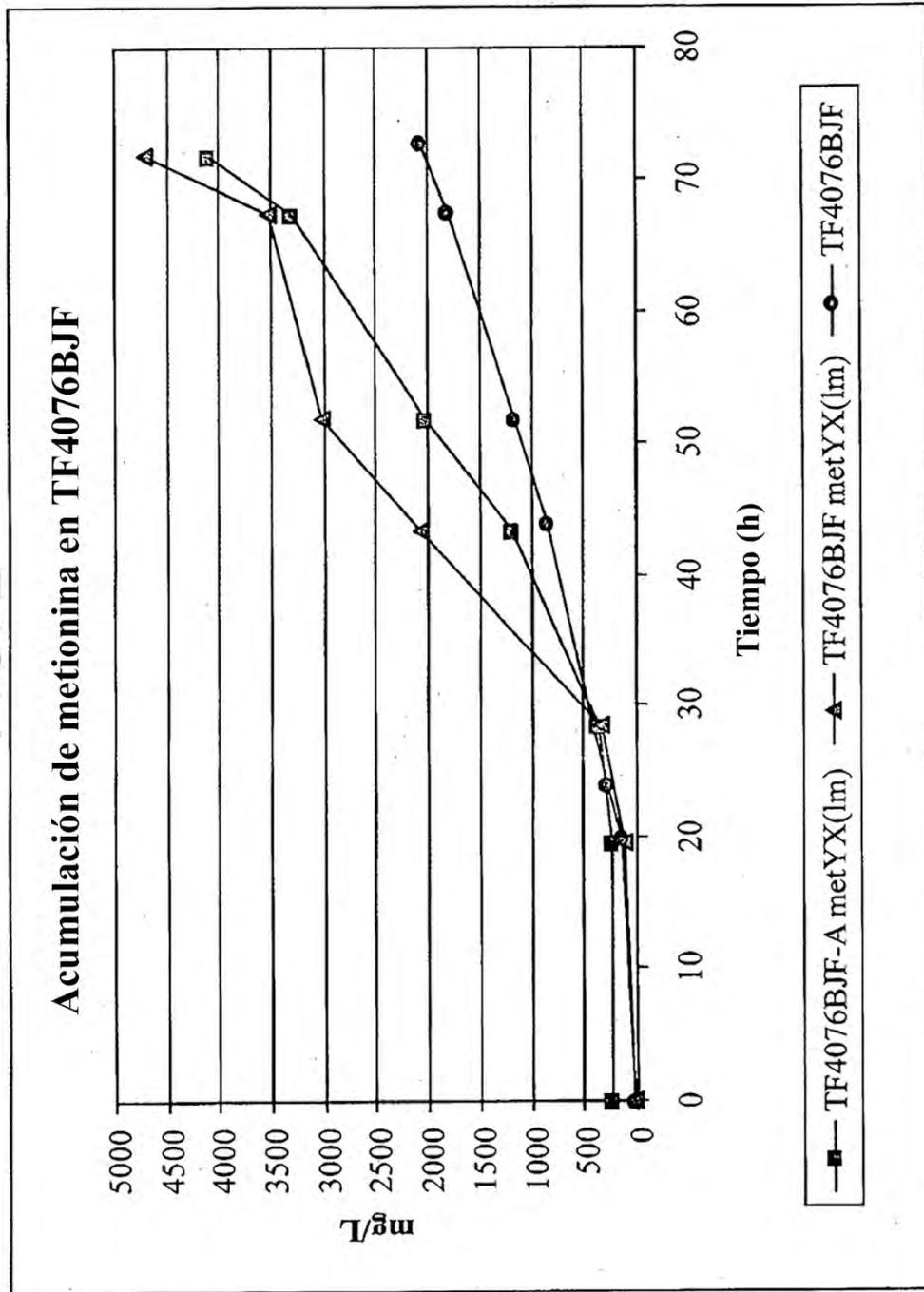


FIG. 2



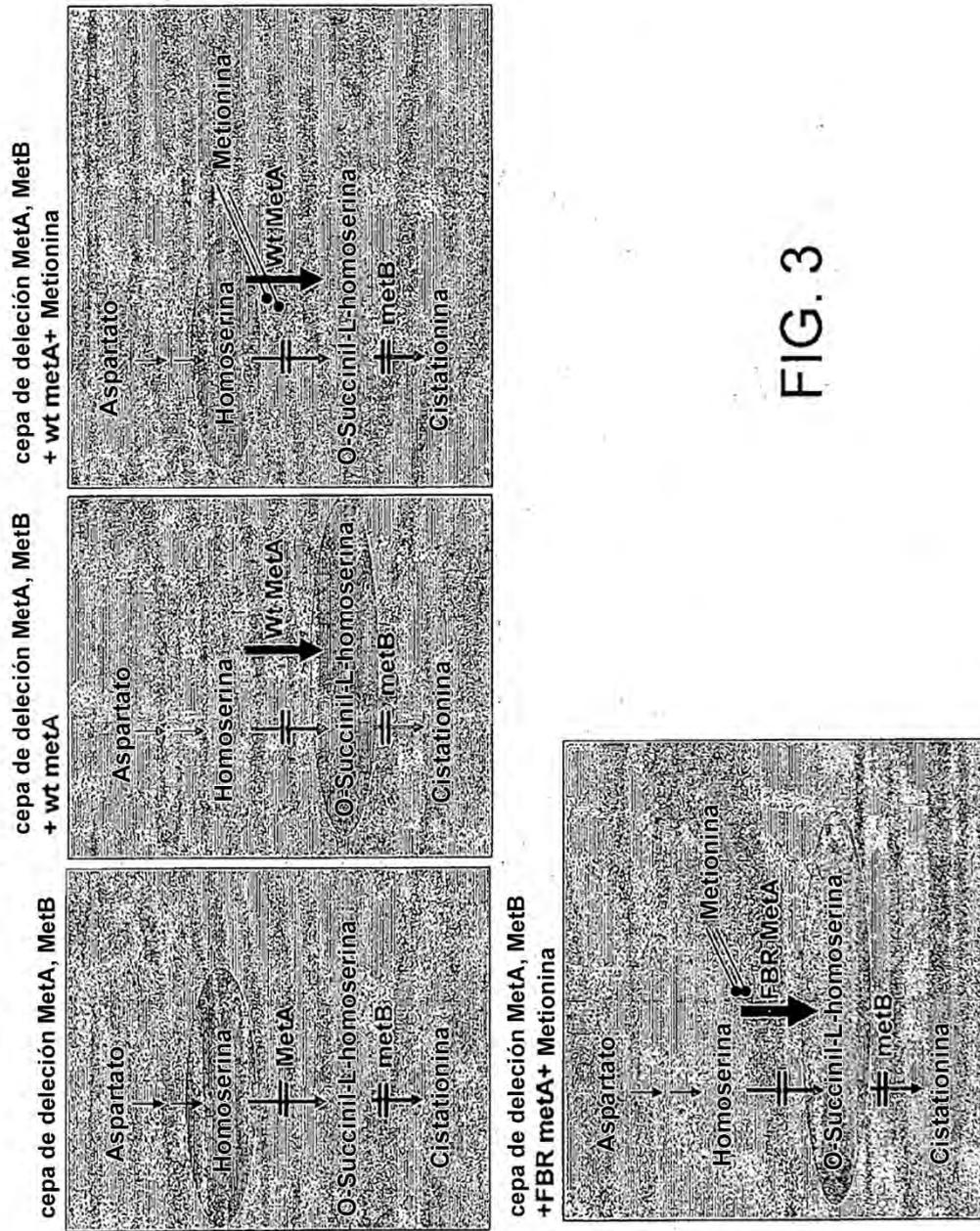


FIG. 3

FIG.4

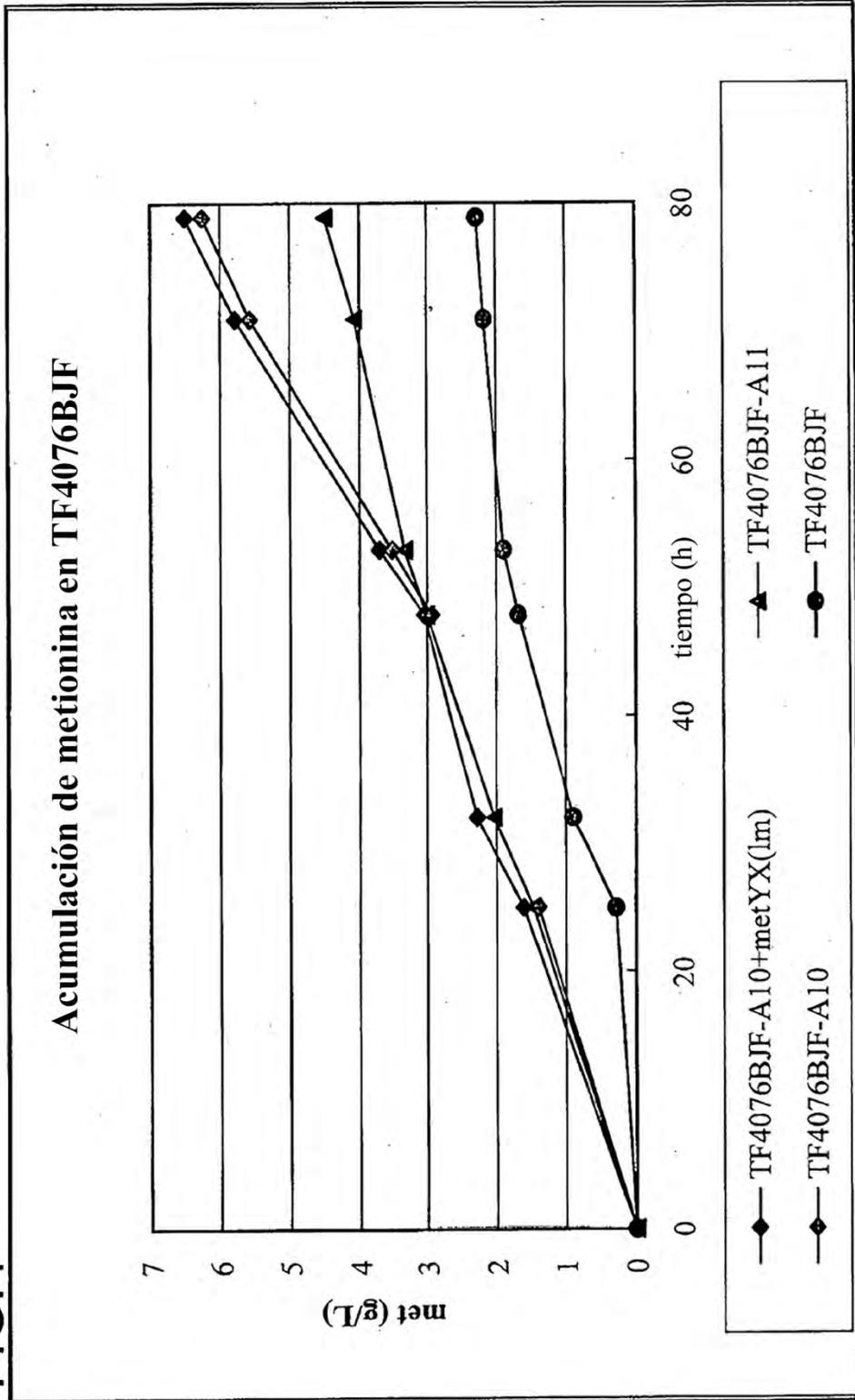


FIG. 5

