

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 453**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2007 E 13178074 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2657345**

54 Título: **Método enzimático para producir L-metionina a partir de un precursor y metilmercaptano**

30 Prioridad:

28.07.2006 KR 20060071581

27.07.2007 KR 20070076045

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

30.12.2016

73 Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center, 330 Dongho-ro Jung-gu
Seoul, KR

72 Inventor/es:

KIM, SO-YOUNG;
CHO, KWANG-MYUNG;
SHIN, YONG-UK;
UM, HYE-WON;
CHOI, KYUNG-OH;
CHANG, JIN-SOOK;
CHO, YOUNG-WOOK y
PARK, YOUNG-HOON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 595 453 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

Método enzimático para producir L-metionina a partir de un precursor y metilmercaptano

5 Campo Técnico

La presente invención se refiere a un método para producir L-metionina y ácido orgánico. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para producir L-metionina y ácido orgánico con un alto rendimiento mediante reacción de conversión enzimática a partir de precursor de L-metionina producido por fermentación de una cepa productora de precursor de L-metionina preparada según la presente invención. El método de la presente invención para producir L-metionina es más beneficioso medioambientalmente que el método convencional y permite una producción selectiva de L-metionina para usar L-metionina en diversos campos de la industria como aditivo alimentario para piensos y comidas, y como materia prima para suministros médicos y fármacos, etc.

15 Antecedentes de la Técnica

La metionina es uno de los aminoácidos esenciales del cuerpo humano que se ha usado ampliamente como aditivo alimentario para piensos y comidas, y además se ha usado como materia prima sintética para disoluciones médicas y suministros médicos. La metionina actúa como precursor de compuestos tales como la colina (lecitina) y la creatina y al mismo tiempo se usa como materia prima sintética para la cisteína y la taurina. La metionina también puede proporcionar azufre. La S-adenosilmetionina se deriva de la L-metionina y desempeña una función concreta para proporcionar grupos metilo en el organismo humano, y también está implicada en la síntesis de varios neurotransmisores en el cerebro. La metionina y/o la S-adenosil-L-metionina (SAM) inhiben la acumulación de grasa en el hígado y las arterias, y alivian la depresión, la inflamación, la enfermedad hepática y el dolor muscular, etc.

Las funciones *in vivo* de la metionina y/o la S-adenosil-L-metionina conocidas hasta el momento son las siguientes:

- 1) Inhibe la acumulación de grasa en el hígado y las arterias promoviendo el metabolismo de lípidos, y mejora la circulación sanguínea en el cerebro, el corazón y el riñón (J. Hepatol. Jeon BR et al., marzo de 2001; 34(3): 395-401).
- 2) Promueve la digestión, la destoxificación y la excreción de sustancias tóxicas, y la excreción de metales pesados tales como el Pb.
- 3) Puede administrarse como un agente anti-depresivo en una dosis de 800 – 1.600 mg/día (Am. J. Clin. Nutr. Mischoulon D. et al., noviembre de 2002; 76(5): 1158S-61S).
- 4) Potencia las funciones hepáticas (FASEB J. Mato JM., enero de 2002; 16(1): 15-26) y es particularmente efectiva para la enfermedad hepática provocada por el alcohol (Cochrane Database Syst Rev., Rambaldi A., 2001; (4): CD0022359).
- 5) Tiene un efecto anti-inflamatorio sobre las enfermedades óseas y de las articulaciones, y promueve la recuperación de articulaciones (ACP J Club. Sander O., enero-febrero de 2003; 138(1): 21, J. Fam. Pract., Soeken KL et al., mayo de 2002; 51(5): 425-30).
- 6) Es un nutriente esencial para el cabello. Proporciona nutrición al cabello y con ello previene la pérdida de pelo (Audiol. Neurotol., Lockwood DS et al., septiembre-octubre de 2000; 5(5): 263-266).

La metionina puede sintetizarse química o biológicamente para ser aplicada a piensos, comida y medicinas.

En la síntesis química, la metionina se produce principalmente mediante hidrólisis de 5-(β-metilmercaptoetil)-hidantoína. La metionina sintetizada químicamente presenta la desventaja de ser producida únicamente como una mezcla del tipo L y el tipo D.

En la síntesis biológica, la metionina se produce mediante un método que usa proteínas implicadas en la síntesis de metionina. La L-metionina se biosintetiza a partir de homoserina por acción de la enzima expresada por genes tales como metA, metB, metC, metE y metH. Particularmente, el metA es el que codifica homoserina O-succinil transferasa, que es la primera enzima necesaria para la biosíntesis de metionina, y convierte homoserina en O-succinil-L-homoserina. La O-succinilhomoserina liasa o cistationina gamma sintasa codificada por el gen metB convierte la O-succinil-L-homoserina en cistationina. La cistationina beta liasa codificada por el gen metC convierte la cistationina en L-homocisteína. El metE codifica metionina sintasa independiente de cobalamina y el metH codifica metionina sintasa dependiente de cobalamina, y ambos convierten L-homocisteína en L-metionina. En este punto, la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa codificada por metF y la serina hidroximetiltransferasa codificada por glyA trabajan juntas para sintetizar N(5)-metiltetrahidrofolato que proporciona el grupo metilo necesario para la síntesis de L-metionina.

La L-metionina es sintetizada por una serie de reacciones orgánicas catalizadas por las anteriores enzimas. La modificación genética de las proteínas anteriores o de otras proteínas que afecten a las proteínas anteriores podría dar como resultado la regulación de la síntesis de L-metionina. Por ejemplo, la Publicación de Patente Abierta Japonesa N° 2000/139471 describe un método para la producción de L-metionina con la *Escherichia* sp. a la que se han eliminado los genes thrBC y metJ, el gen metBL ha sido sobre-expresado y el metK se ha reemplazado por un

mutante. Asimismo, la Publicación de Patente de EE.UU. N° US2003/00920026 A1 describe un método que usa un microorganismo de bloqueo de metD (inhibidor de la síntesis de L-metionina) que pertenece a *Corynebacterium* sp. La Publicación de Patente de EE.UU. N° US2002/0049305 describe un método para incrementar la producción de L-metionina aumentando la expresión de 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (metF).

La Patente de EE.UU. N° US2005/0054060 A1 describe el método de preparación de microorganismo productor de L-metionina que usa un mutante de cistationina sintasa (O-succinilhomoserina liasa). Esta cistationina sintasa mutante puede producir homocisteína o metionina directamente a partir de H₂S o CH₃SH en lugar de cisteína. En este método, el mutante de cistationina sintasa se introduce directamente en una célula y participa en el procedimiento de biosíntesis de metionina intracelular. En este método, la reacción de cistationina sintasa no es muy efectiva debido al uso de la ruta de biosíntesis de metionina intracelular. También, la elevada toxicidad del H₂S o el CH₃SH para las células reduce la eficacia de este método. En nuestro experimento, también descubrimos que la especificidad de sustrato de la cistationina sintasa para CH₃SH es muy lenta comparada con la succinilhomoserina liasa derivada de *Pseudomonas* o *Chromobacterium* sp.

Según las publicaciones anteriores, la cistationina sintasa tiende a producir varios productos por reacción con varios sustratos. La cistationina sintasa media en la interacción entre la homocisteína y la O-succinil homoserina para producir homolantionina con una elevada eficacia (J. Bacteriol. (2006) vol. 188: p. 609-618). La cistationina sintasa de una célula puede interaccionar con varios precursores de metionina y puede producir varios subproductos con una elevada eficiencia. Por tanto, la sobreexpresión de Cistationina sintasa puede reducir la eficacia de la reacción debido a la mayor producción de subproductos.

La metionina producida mediante el método biológico convencional es de tipo L, lo que tiene ventajas, pero la cantidad de producción es demasiado baja. Esto es debido a que la ruta biosintética de metionina tiene sistemas de regulación retroalimentados muy estrictos. Una vez que la metionina se ha sintetizado a un nivel determinado, la metionina del producto final inhibe la transcripción del gen metA que codifica la proteína primaria para el inicio de la biosíntesis de metionina. La sobre-expresión del gen metA por sí misma no puede aumentar la producción de metionina debido a que el gen metA es suprimido por la metionina en la etapa de transcripción y a continuación es degradado por las proteasas intracelulares de la etapa de traducción (Dvora Biran, Eyal Gur, Leora Gollan y Eliora Z. Ron: Control of methionine biosynthesis in *Escherichia coli* by proteolysis: Molecular Microbiology (2000) 37(6), 1436-1443). Por lo tanto, muchas de las patentes previas se han centrado en cómo liberar el gen metA de su sistema de regulación de retroalimentación (WO2005/108561, WO1403813).

Cuando se produce la metionina en un sistema biológico, la metionina producida se convierte en S-adenosilmetionina mediante S-adenosilmetionina sintasa en la ruta de degradación de la metionina. La S-adenosilmetionina sintasa no puede ser eliminada ya que la S-adenosilmetionina es una sustancia esencial en las células. Según las patentes previas, el gen que codifica S-adenosilmetionina sintasa se ha mutado para presentar una baja actividad a fin de incrementar la producción de metionina (WO2005/108561).

Rowbury (J. Gen. Microbiol., 1964, 37, 171-80) se refiere a la acumulación de O-succinilhomoserina por *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Giovanelli y Mudd (Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, 31, pág. 275-80) se refieren a la sulfuración de la O-acetilhomoserina y la O-acetilserina por acción de dos fracciones enzimáticas procedentes de la espinaca. Kromer et al (Metabolic Engineering, 2006, 8, 353-69) se refiere al análisis de las vías metabólicas para el diseño racional de la producción de L-metionina por *Escherichia coli* y *Corynebacterium glutamicum*.

Descripción de la Invención

El método convencional de biosíntesis de metionina usa la ruta metabólica de cistationina sintasa para producir metionina, de tal modo que el proceso de reacción enzimática es ineficiente debido a la toxicidad de sulfuros y a la generación de subproductos. Adicionalmente, la regulación de la retroalimentación en la ruta de síntesis de metionina inhibe la producción en masa de la metionina.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método alternativo para la producción de L-metionina para superar los problemas del método convencional. El método alternativo está constituido por un proceso de dos etapas en el que el precursor de L-metionina se produce mediante fermentación y el precursor de L-metionina es convertido en L-metionina por enzimas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para producir L-metionina de forma selectiva.

Además, se divulga un método para producir de forma simultánea un ácido orgánico como subproducto sin un proceso adicional.

De aquí en adelante, la presente invención se va a describir detalladamente. Las realizaciones de la presente invención son como se definen en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un método para producir L-metionina que comprende:

i) cultivar una cepa productora de precursor de L-metionina en una solución de fermentación, de tal forma que el precursor de L-metionina que es un compuesto de O-acilhomoserina de fórmula 1 se acumula en la solución de fermentación;



[Fórmula 1]

y

ii) añadir una enzima convertidora y metilmercaptano o sus diferentes formas a la solución de fermentación para convertir el precursor de L-metionina a L-metionina; donde R de la fórmula 1 es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono como máximo y en donde la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) se caracteriza por una expresión o actividad potenciada de homoserina O-succinil transferasa u homoserina O-acetil transferasa. En determinadas realizaciones, el gen que codifica homoserina O-succinil transferasa es metA y el gen que codifica homoserina O-acetil transferasa es metX.

La presente invención también se refiere a un método para producir L-metionina que comprende:

i) cultivar una cepa productora de precursor de L-metionina en una solución de fermentación, de tal forma que el precursor de L-metionina que es un compuesto de O-acilhomoserina de fórmula 1 se acumula en la solución de fermentación;



[Fórmula 1]

y

ii) añadir una enzima convertidora y metilmercaptano o sus diferentes formas a la solución de fermentación para convertir el precursor de L-metionina en L-metionina;

en donde R de la fórmula 1 es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono como máximo y en donde la cepa productora de precursor de L-metionina se caracteriza por una actividad suprimida o debilitada de cistationina gamma sintasa o de O-succinilhomoserina sulfhidrilasa o de O-acetilhomoserina sulfhidrilasa implicada en la degradación del precursor de L-metionina. En determinadas realizaciones, la cistationina gamma sintasa o la O-succinidilhomoserina sulfhidrilasa o la O-acetilhomoserina sulfhidrilasa está codificada, respectivamente, por metB o metZ o metY o sus genes mutantes.

La presente invención también se refiere a un método para producir L-metionina que comprende:

i) cultivar una cepa productora de precursor de L-metionina en una solución de fermentación, de tal forma que el precursor de L-metionina que es un compuesto de O-acilhomoserina de fórmula 1 se acumula en la solución de fermentación;



[Fórmula 1]

y

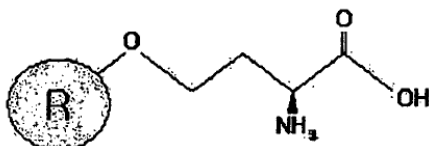
ii) añadir una enzima convertidora y metilmercaptano o sus diferentes formas a la solución de fermentación para convertir el precursor de L-metionina en L-metionina;

en donde R de la fórmula 1 es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono

como máximo y en donde la enzima convertidora y el metilmercaptano o sus diferentes formas de la etapa ii) se mezclan directamente con el sobrenadante de la solución de fermentación de la etapa i) para iniciar la reacción.

La presente invención también se refiere a un método para producir L-metionina que comprende:

- i) cultivar una cepa productora de precursor de L-metionina en una solución de fermentación, de tal forma que el precursor de L-metionina que es un compuesto de O-acilhomoserina de fórmula 1 se acumula en la solución de fermentación;



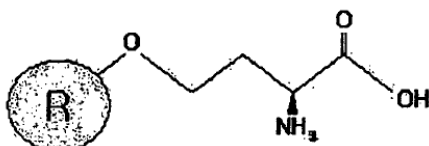
[Fórmula 1]

- ii) añadir una enzima convertidora y metilmercaptano o sus diferentes formas a la solución de fermentación para convertir el precursor de L-metionina en L-metionina;

en donde R de la fórmula 1 es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono como máximo y en donde la enzima convertidora procede de una cepa bacteriana recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una cistation gamma sintasa o una O-succinilhomoserina sulfhidrasa o una O-acetilhomoserina sulfhidrilasa. En determinadas realizaciones, la enzima recombinante se produce usando una secuencia de ácido nucleico de una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacteria* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Salmonella* sp., *Brevibacteria* sp., *Hyphomonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Nocardia* sp., hongos y levaduras.

La presente invención también se refiere a un método para producir L-metionina que comprende:

- i) cultivar una cepa productora de precursor de L-metionina en una solución de fermentación, de tal forma que el precursor de L-metionina que es un compuesto de O-acilhomoserina de fórmula 1 se acumula en la solución de fermentación;



[Fórmula 1]

- ii) añadir una enzima convertidora y metilmercaptano o sus diferentes formas a la solución de fermentación para convertir el precursor de L-metionina en L-metionina;

en donde R de fórmula 1 es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono como máximo y en donde la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) es una cepa cuyas rutas de biosíntesis de treonina, isoleucina o lisina están debilitadas o suprimidas. En determinadas realizaciones, la cepa se caracteriza por una homoserina cinasa eliminada o debilitada implicada en la ruta de biosíntesis de treonina, preferentemente, el gen que codifica la homoserina cinasa es thrB.

En determinadas realizaciones, dicho precursor de L-metionina es O-acetil homoserina u O-succinil homoserina. En determinadas realizaciones, la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) se selecciona entre el grupo que consiste en *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Salmonella* sp., *Brevibacterium* sp., *Hyphomonas* sp., *Chromobacterium* sp. y *Nocardia* sp. u hongos o levaduras, preferentemente, la cepa productora de precursor de L-metionina se selecciona entre *Escherichia* sp. o *Corynebacterium* sp., más preferentemente, la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) es *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum*. En determinadas realizaciones, en donde la enzima convertidora que convierte al precursor de L-metionina en metionina de la etapa ii) se obtiene de una cepa seleccionada entre el grupo que consiste en *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Salmonella* sp., *Brevibacterium* sp., *Hyphomonas* sp., *Chromobacterium* sp. y *Nocardia* sp. u hongos o levaduras. En determinadas realizaciones, la enzima convertidora

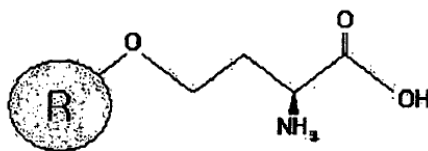
se obtiene a partir de una cepa seleccionada entre el grupo que consiste en *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aurogenosa*, *Pseudomonas putida*, *Corynebacteria glutamicum*, *Leptospira meyeri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Chromobacterium Violaceum*, *Nocardia Farcinica*, *Bradyrhizobium Japonicum*, *Hyphomonas Neptunium*, *Methylococcus Capsulatus*, *Methylobacillus Flagellatus*, *Nitrosomonas Europaea*, *Klesiella Pneumoniae*, *Bacillus Subtilis*, y *Shigella flexneri*.

En el presente documento se describe un método para producir L-metionina que comprende las etapas de 1) preparar una cepa productora de precursor de L-metionina y producir precursor de L-metionina mediante la fermentación de la cepa, y 2) producir L-metionina y ácido orgánico mediante la reacción enzimática con el precursor de L-metionina.

En particular, en la etapa i) del proceso de la presente invención, se genera una cepa que produce precursor de L-metionina y se fermenta para la acumulación de precursor de L-metionina en el medio de cultivo. En ese momento, se prepara la cepa para la producción de precursor de L-metionina mediante un método diseñado por los inventores, por lo que la presente descripción también incluye la cepa y el método para generar la cepa.

El precursor de L-metionina del presente documento está representado por uno de los grupos O-acil homoserina compuestos por la siguiente fórmula:

[Fórmula 1]



en donde

R es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono como máximo. Por ejemplo, en grupo O-acil homoserina incluye, aunque sin limitación, O-acetil homoserina, O-succinil homoserina, propionil homoserina, acetoacetil homoserina, coumaroil homoserina, malonil homoserina, hidroximetilglutaril homoserina y pimelilhomoserina.

El precursor de L-metionina de la presente invención es preferentemente O-acetil homoserina u O-succinil homoserina.

La "cepa productora de precursor de L-metionina", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cepa de microorganismos procarióticos o eucarióticos que es capaz de acumular precursor de L-metionina mediante la manipulación según la presente invención. Por ejemplo, la cepa se puede seleccionar del grupo que consiste en los microorganismos *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacteria* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Salmonella* sp., *Brevibacteria* sp., *Hypomononas* sp., *Chromobacterium* sp. y *Nocardia* sp. u hongos o levaduras. Preferiblemente, los microorganismos de *Pseudomonas* sp., *Nocardia* sp. y *Escherichia* sp. se pueden usar para producir O-succinilhomoserina, y los microorganismos de *Escherichia* sp., *Corynebacterium* sp., *Reptospira* sp. y levaduras se pueden usar para producir O-acetilhomoserina. Más preferiblemente, se pueden usar los microorganismos de *Escherichia* sp., y con la mayor preferencia se puede usar *Escherichia coli* (denominada a partir de aquí "E. coli"). Adicionalmente, se pueden introducir genes extraños en el microorganismo de *Escherichia* sp. para producir selectivamente O-succinil homoserina y O-acetil homoserina.

Preferentemente, la presente invención usa una cepa productora de precursor de L-metionina en la que los genes implicados en la degradación de O-succinil homoserina u O-acetil homoserina son eliminados o debilitados. Preferentemente, la presente invención usa también una cepa productora de precursor de L-metionina en la que se introducen o potencian los genes implicados en la síntesis de O-succinil homoserina u O-acetil homoserina. Preferentemente, la presente invención también usa de manera selectiva una cepa en la que la ruta de biosíntesis de treonina esté bloqueada o debilitada para potenciar la producción de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina. Adicionalmente, la cepa puede ser una cepa en la que se introducen, sobre-expresan o potencia en actividad los genes que están libres del sistema de regulación de retroalimentación y que codifican las proteínas implicadas en la síntesis de O-succinil homoserina u O-acetil homoserina.

Más particularmente, la presente invención usa una cepa productora de precursor de L-metionina eliminando el gen metB implicado en la degradación del precursor de L-metionina, el gen thrB implicado en la ruta de biosíntesis de treonina y el gen metJ que reprime la transcripción del gen de síntesis de precursor de L-metionina y potenciando la expresión del gen metA o metX implicado en la biosíntesis del precursor de L-metionina o introduciendo el gen metA o metX libre de sistema de regulación retroalimentada o suprimiendo génicamente el gen metA y en su lugar introduciendo el gen metX, o eliminando el gen metX y en su lugar introduciendo el gen metA.

En la presente invención, se puede llevar a cabo una eliminación del gen cortando una región del gen o modificando la secuencia de proteína mediante la introducción de una secuencia de ADN específica en el cromosoma. El debilitamiento del gen se puede llevar a cabo reduciendo la actividad de la proteína introduciendo la mutación en la región ORF del gen diana o reduciendo la expresión de proteína a través de la modificación de una región promotora o de secuencia de nucleótidos 5'-UTR del gen.

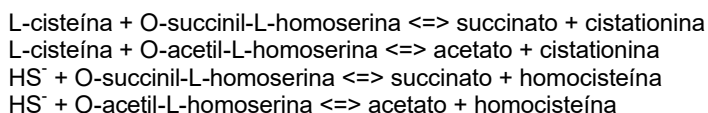
En la presente invención, se puede llevar a cabo el potenciamiento de la expresión de proteína mediante la modificación de la región promotora del gen o la secuencia de nucleótidos de la región 5'-UTR, y se puede llevar a cabo el potenciamiento de la actividad de la proteína mediante la introducción de la mutación en la región ORF del gen diana, y también se puede llevar a cabo el potenciamiento de la expresión de proteína mediante la introducción de la copia extra de gen diana en el cromosoma o mediante la introducción del vector que aloja el gen diana con el auto-promotor u otro promotor potenciado de la cepa.

En una realización preferida de la presente invención, el método para preparar una cepa productora de precursor de L-metionina es como se indica a continuación:

En la etapa 1, se elimina o se debilita un gen que codifica proteínas tales como cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa en una cepa a fin de acumular precursor L-metionina tal como O-succinil homoserina u O-acetil homoserina.

El gen que codifica cistationina gamma sintasa se indica como metB, el gen que codifica O-succinilhomoserina sulfhidrilasa se indica como metZ, y el gen que codifica O-acetilhomoserina sulfhidrilasa se indica como metY. Un ejemplo de gen que codifica la proteína que tiene la actividad mencionada anteriormente es el metB, que está presente en *E. coli*. La secuencia genómica del gen se puede obtener a partir de la secuencia genómica de *E. coli* (Nº de Acceso: AAC75876) publicada previamente (Blattner et al., Science 277: 1453-1462 (1997)). La anterior secuencia genómica también se puede obtener a partir del NCBI (National Center for Biotechnology Information) and DDBJ (DNA Data Bank Japan). Otros ejemplos de gens que presentan la anterior actividad son el metB y el metY derivados de *Corynebacterium*, y el metZ derivado de *Pseudomonas*.

La cistationina gamma sintasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa tiene la actividad de convertir O-succinil homoserina y O-acetil homoserina en cistationina u homocisteína, como se muestra en las siguientes fórmulas de reacción. Por lo tanto, la cepa en la que los genes que presentan estas actividades han sido eliminados o debilitados, demostró una acumulación de O-succinil homoserina u O-acetil homoserina en la disolución de cultivo.



En la etapa 2, el gen thrB que codifica homoserina quinasa en la cepa preparada en la etapa (i) es eliminado o debilitado. El gen thrB está implicado en la síntesis de O-fosfohomoserina a partir de homoserina, que a su vez es convertida en treonina por el gen thrC. El gen thrB es eliminado o debilitado para usar toda la homoserina producida para la síntesis de precursor de metionina.

En la etapa 3, el gen metJ, que es el regulador de la transcripción del gen metA, es eliminado o debilitado. El gen metA implicado en la síntesis de precursor de metionina está regulado por el sistema de regulación retroalimentado de la metionina y el gen metJ es un represor implicado en la transcripción del gen metA. Para sobre-expresar el gen metA constitutivamente y activar la síntesis de precursor de metionina, la eliminación del represor de transcripción de gen metA es beneficiosa. Por lo tanto, el gen metJ es eliminado en *E. coli* y la expresión de gen metA es aumentada, lo que puede conducir a la producción masiva de precursor de L-metionina.

Las etapas 2 y 3 anteriores pueden modificarse de acuerdo a una cepa productora de precursor y podrían no ser necesarias para la cepa productora de precursor. Sin embargo, preferiblemente pueden ejecutarse para potenciar la ruta de producción de precursor en el microorganismo *Escherichia* sp.

En la etapa 4, se potencia la expresión de gen metA y metX que codifican la homoserina O-succinil transferasa o la homoserina O-acetil transferasa, que es la primera etapa mediada por enzima de la ruta de biosíntesis de la metionina, para promover la síntesis de precursor de metionina. El gen metA es el término general para el gen que codifica homoserina O-succinil transferasa, y el gen metX es el término general para el gen que codifica homoserina O-acetil transferasa. Para potenciar la expresión de gen metA o metX, se puede introducir una copia adicional de gen o se puede modificar la 5'-UTR o un promotor o se puede mutar cada gen. El potenciamiento de la expresión de dicho gen da como resultado un aumento significativo de la síntesis de precursor de L-metionina.

Si se considera que la metionina es necesaria para el crecimiento de una cepa, se puede introducir el gen metA o metX libre de regulación retroalimentada. En este caso, el precursor de L-metionina se puede sintetizar

independientemente del contenido de metionina del medio y así la adición de metionina al medio facilita la síntesis de precursor de L-metionina y el crecimiento de las células.

Para aumentar la producción de O-acetilhomoserina a partir de cepa productora de O-succinilhomoserina, se puede eliminar el gen *metA* que codifica homoserina O-succinil transferasa que existe en el cromosoma. Cuando se inhibe la producción de O-succinilhomoserina por eliminación del gen *metA* y se produce O-acetilhomoserina por introducir adicionalmente gen *metX*, se puede producir O-acetilhomoserina con un rendimiento superior al obtenido en el caso de introducir el gen *metX* en presencia del gen *metA*.

También es posible aumentar la producción de O-succinilhomoserina en la cepa productora de O-acetilhomoserina eliminando el gen *metX* que codifica homoserina O-acetil transferasa que existe en el cromosoma de la cepa. Cuando se inhibe la producción de O-acetilhomoserina por eliminación del gen *metX* y se produce O-succinilhomoserina introduciendo adicionalmente gen *metA*, se puede producir O-succinilhomoserina con un mayor rendimiento.

La O-succinilhomoserina o la O-acetilhomoserina, precursor de L-metionina, se pueden acumular en una cepa aprovechando una parte del proceso completo de las anteriores etapas 1 a 4.

La cepa productora de precursor de L-metionina se puede preparar a partir de la cepa que produce L-lisina, L-treonina o L-isoleucina. Preferiblemente, se puede preparar usando la cepa productora de L-treonina. Con esta cepa, la síntesis de homoserina ya es mayor y, como resultado, la producción de precursor de metionina puede aumentar. Así, se puede acumular precursor de metionina eliminando o debilitando un gen implicado en la ruta de biosíntesis de treonina y a continuación el gen *metA* o *metY* o *metZ*, usando cepa productora de L-treonina. Es más preferible eliminar o debilitar el gen *thrB* primero y a continuación el *metB*, *metY* o *metZ* para sintetizar el precursor de metionina. Mientras tanto, el potenciamiento de la expresión génica de *metA* o *metX* da como resultado el incremento de precursor de metionina.

La "cepa productora de L-treonina" se refiere a una cepa de microorganismo procariótico o eucariótico que es capaz de producir L-treonina *in vivo*. Por ejemplo, la cepa puede incluir cepas de microorganismos que producen L-treonina que pertenecen a *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp. y *Brevibacterium* sp. Entre estos, los microorganismos *Escherichia* sp. son los preferidos, y más preferido es el *Escherichia coli*.

La cepa productora de L-treonina incluye no solo los microorganismos naturales sino también sus mutantes, representados por microorganismos que presenta un requerimiento de isoleucina y que son resistentes a análogos de L-lisina y ácido α -aminobutírico; y son mutados mediante la introducción adicional de al menos una copia extra de gen endógeno de fosfoenol piruvato carboxilasa (*ppc*); y son desactivados en el gen *pckA* implicado en el proceso de conversión de oxaloacetato (OAA) que es un intermedio de la síntesis de L-metionina en fosfoenol piruvato (PEP); y son desactivados en gen *tyrR* que inhibe la expresión de gen *tyrB* implicado en la biosíntesis de L-metionina; y son desactivados en gen *galR* que inhibe la expresión de gen *galP* implicada en el transporte de glucosa. Los análogos de L-lisina en el presente documento pueden ser uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en S-(2-aminoetil)-L-cisteína y δ -metil-L-lisina.

En una realización preferida de la presente invención, se usó CJM002, la cepa productora de L-treonina e independiente de L-metionina mutada a partir de TF4076 (KFCC 10718, Patente Coreana N° 92-8365), la cepa mutante de *E. coli* productora de L-treonina. La TF4076 tiene un requerimiento para metionina, y es resistente a análogos de metionina (por ejemplo, ácido α -amino- β -hidroxi valérico, AHV), a análogos de lisina (por ejemplo, S-(2-aminoetil)-L-cisteína, AEC), y a análogos de isoleucina (por ejemplo, ácido α -aminobutírico). La TF4076 no es capaz de sintetizar metionina *in vivo* debido a que es la cepa que presenta un requerimiento para metionina. Para usar esta cepa como cepa productora de metionina de la invención libre de un requerimiento para metionina, los inventores de la presente prepararon la cepa productora de L-treonina de *E. coli* CJM002 libre del requerimiento para metionina empleando una mutación artificial usando NTG. La CJM002 de *E. coli* fue denominada *Escherichia coli* MF001 y se depositó en el KCCM (Korean Culture Center of Microorganism, Edif. Eulim, Hongje-1-Dong, Seodaemun-Ku, Seúl, 361-221, Corea), el 9 de abril de 2004 (N° de Acceso: KCCM-10568). También se depositó la CJM-BTJ (pMetA-CL) de *Escherichia coli* productora de O-succinilhomoserina, preparada por el método anterior, el 21 de julio de 2006 (N° de Acceso: KCCM-10767) y la CJM-BTJ (pCJ-MetA-CL) de *Escherichia coli* se depositó el 5 de julio de 2007 (N° de Acceso: KCCM-10872). La CJM-BTJA (pCJ-MetX-CL) de *Escherichia coli* productora de O-acetilhomoserina, preparada mediante el método anterior de la invención, también se depositó el 5 de julio de 2007 (N° de Acceso: KCCM-10873).

El cultivo de la cepa productora de precursor de L-metionina preparado anteriormente se puede llevar a cabo mediante un medio apropiado usando las condiciones conocidas por los especialistas en la técnica. Los especialistas en la técnica entienden sobradamente que el método de cultivo se puede usar ajustando fácilmente según la cepa seleccionada. Por ejemplo, el método de cultivo que incluye, aunque sin limitación, el cultivo por cargas, continuo y por cargas alimentado. En la siguiente referencia se describe una variedad de métodos de cultivo: "Biochemical Engineering" por James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pág. 138-176.

El método debe cumplir las condiciones de cultivo para una cepa específica. En la siguiente referencia se describe una variedad de medios de cultivo de microorganismos: "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology, Washington D.C., EE.UU., 1981. Dichos medios incluyen varias fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y elementos traza. Un ejemplo de fuente de carbono son carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, celulosa; lípidos tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Se puede usar como fuente de carbono uno de los compuestos o una mezcla de los mismos. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de maíz fermentado (CSL, del inglés "corn steep liquor") y harina de judía, y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Se puede usar como fuente de nitrógeno uno de estos compuestos o una mezcla de los mismos. En el presente documento, el medio puede incluir como adicionalmente como fuente de fosfatos dihidrógeno fosfato de potasio, hidrógeno fosfato de dipotasio y las correspondientes sales de sodio. El medio también puede incluir una sal metálica tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Adicionalmente, también se pueden añadir aminoácidos, vitaminas y los precursores apropiados. Los medios o los precursores se pueden añadir al cultivo por cargas o de forma continua.

El pH del cultivo se puede ajustar durante el cultivo añadiendo de un modo apropiado un compuesto del tipo hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. Se puede inhibir la generación de burbujas durante el cultivo usando un agente antiespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso. Para mantener las condiciones aerobias del cultivo, se puede inyectar oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) al cultivo. La temperatura del cultivo convenientemente es de 20-45°C, preferiblemente de 25-40°C. El periodo de cultivo puede continuar hasta que la producción de precursor de L-metionina alcanza un nivel deseado, y el tiempo de cultivo preferido es de 10-160 horas.

La etapa ii) del proceso incluye el proceso de producción de L-metionina y ácido orgánico mediante reacción enzimática usando una enzima que tiene la actividad de cistationina sintasa o de O-succinilhomoserina sulfhidrilasa o de O-acetilhomoserina sulfhidrilasa, o la cepa que contiene estas actividades enzimáticas, usando O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina producidas a partir de la anterior cepa productora de precursor de L-metionina y metil mercaptano como sustrato.

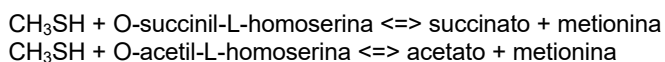
Más particularmente, la presente invención proporciona el método para producir L-metionina mediante reacción enzimática de cistationina sintasa o de O-succinilhomoserina sulfhidrilasa o de O-acetilhomoserina sulfhidrilasa usando la homoserina, la O-succinil homoserina o la O-acetil homoserina acumuladas en el método anterior como sustrato. En la presente invención es preferible usar como sustrato O-succinil homoserina u O-acetil homoserina.

En la presente invención, la cistationina gamma sintasa o la O-succinilhomoserina sulfhidrilasa o la O-acetilhomoserina sulfhidrilasa pueden derivarse de *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Corynebacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Chromobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Hyphomonas* sp., *Methylococcus* sp., *Methylobacillus* sp., *Nitrosomas* sp., *Klesiella* sp., *Bacillus* sp., *Shigella* sp., *Colwellia* sp., *Salmonella* sp., de levaduras o de hongos.

En el proceso de etapa ii), cuando se usa O-succinil homoserina como precursor de L-metionina, se puede usar preferiblemente cistationina gamma sintasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa derivadas de *Pseudomonas* sp., *Nocardia* sp. o *Chromobacterium* sp., más preferiblemente derivadas de *Pseudomonas aurogenosa*, *Nocardia farcinica*, *Pseudomonas putida* o *Chromobacterium violaceum*.

En el proceso de etapa ii), cuando se usa O-acetil homoserina como precursor de L-metionina, se puede usar preferiblemente cistationina gamma sintasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa derivadas de *Lectospira* sp., *Chromobacterium* sp. o *Hyphomonas* sp., más preferiblemente derivadas de *Leptospira meyeri*, *Pseudomonas aurogenosa*, *Hyphomonas neptunium* o *Chromobacterium violaceum*.

Las anteriores reacciones enzimáticas se muestran en las siguientes fórmulas de reacción, y las fórmulas estructurales se muestran en la Figura 2.



En las anteriores reacciones, tal como se muestra en las fórmulas de la Figura 2, el residuo CH₃S- del metilmercaptano es sustituido por un residuo succinato o acetato de la O-succinil homoserina o la O-acetil homoserina para producir metionina. El metil mercaptano (CH₃SH) puede añadirse de diferentes formas durante la reacción.

La secuencia de los genes que codifican las enzimas que presentan la anterior actividad enzimática puede obtenerse a partir de la base de datos NCBI, EE.UU., y el DNA data bank (KEGG), Japón.

Para la reacción de conversión biológica, se clona un gen procedente de la secuencia génica obtenida, que a continuación es introducido en un vector de expresión. La enzima se expresa en forma activa a partir de una cepa recombinante. Tanto la cepa que expresa enzima como la enzima expresada pueden usarse directamente para la reacción.

Las enzimas expresadas a partir de los anteriores genes o las cepas microbianas que expresan dichas enzimas pueden mezclarse directamente, parcialmente o no, con el sobrenadante de fermentación o con el caldo de fermentación acumulado con precursor de L-metionina para iniciar la reacción. En una realización preferida de la invención, la O-succinil homoserina o la O-acetil homoserina acumuladas en la disolución de fermentación pueden ser convertidas en metionina mediante cistationina gamma sintasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa derivadas de *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Leptospira* sp. o *Hyphomonas* sp.

Más preferiblemente, la O-succinilhomoserina acumulada en la disolución de fermentación es convertida en metionina mediante cistationina gamma sintasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa derivadas de *Pseudomonas aurogenosa*, *Pseudomonas putida* o *Chromobacterium violaceum*.

Más preferiblemente, la O-succinil homoserina acumulada en la disolución de fermentación es convertida en metionina mediante cistationina gamma sintasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa derivadas de *Pseudomonas aurogenosa*, *Pseudomonas putida* o *Chromobacterium violaceum*.

La O-acetilhomoserina acumulada en la disolución de fermentación es convertida en metionina mediante cistationina gamma sintasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa derivadas de *Leptospira meyeri*, *Hyphomonas neptunium* o *Chromobacterium violaceum*.

Se expresaron todos los genes en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea), el vector de expresión para *E. coli*, y la proteína expresada se obtuvo a partir de la disolución enzimática preparada mediante lisis celular usando ultrasonidos. Se añadió la disolución enzimática a la disolución de fermentación acumulada en O-succinil homoserina u O-acetil homoserina, y también se añadió disolución de metilmercaptano para iniciar la reacción. La reacción fue confirmada usando DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitro-benzonico), Sigma, EE.UU.) y el producto de reacción fue analizado mediante HPLC.

En el presente método, se pueden obtener adicionalmente subproductos tales como ácido succínico o ácido acético, sin un proceso de producción separado, mediante reacción de CH₃SH con O-succinil homoserina y O-acetil homoserina, respectivamente.

Breve Descripción de las Figuras

La aplicación de las realizaciones preferidas de la presente invención se entiende mejor haciendo referencia a las figuras anexas, en las que:

Figura 1: es un diagrama que ilustra la manipulación genética de la cepa productora de precursor de metionina.

Figura 2: es un diagrama que ilustra las estructuras químicas del proceso de 2 etapas para la producción de metionina.

Figura 3: es un diagrama esquemático de pMetA-CL para la expresión de gen metA.

Figura 4: es un diagrama esquemático de pCJ-MetB-CL para la expresión de gen metB.

Figura 5: es un gráfico que muestra las curvas de reacción que ilustran los consumos de O-succinil homoserina por varias enzimas.

El origen de cada disolución enzimática es como se indica a continuación. La disolución enzimática nº 21 es un extracto celular que no contiene un gen específico.

Cepa	Número de cepa (ATCC)	Nombre del gen (KEGG)	Especificidad de sustrato	
			OSH	OAH
Escherichia coli K 12	55151	MetB	+	+
Pseudomonas aurogenosa	17933	MetZ	+++	+
		MetY	++++	++++
Pseudomonas putida	17390	MetZ	++++	+
Corynebacteria glutamicum	13032	MetB	+	+
		MetY	+	+
Leptospira meyeri	43278	MetY	+	++
Saccharomyces cerevisiae	2704	Met25	+	+
Chromobacterium violaceum	12472	MetZ	++++	+++
Nocardia farcinica	3318	MetZ	++++	+
Bradyrhizobium japonicum	10324	MetZ	+	+

Cepa	Número de cepa (ATCC)	Nombre del gen (KEGG)	Especificidad de sustrato	
			OSH	OAH
Hyphomonas neptunium	49408	MetZ	+	++++
Methylococcus capsulatus	19069D-5	MetZ	+	+
Methylobacillus flagellatus	51484D	MetZ	+	+
Nitrosomonas europaea	19718D	MetZ	+	+
Klesiella pneumoniae	25955	MetB	+	+
Bacillus subtilis	10783	MetB	+	+
Shigella flexneri 2457T	700930D-5	MetB	+	+

Figura 6: es un gráfico que muestra las curvas de reacción que ilustran los consumos de O-acetil homoserina para varias enzimas. Cada número es tal como se muestra en la Figura 5.

- 5 Figura 7: es un diagrama que ilustra la secuencia de aminoácidos de cada enzima usada para la reacción de conversión dispuesta mediante megalign de DNASTar.

Ejemplos:

10 Ejemplo 1: Construcción de una cepa productora de precursor de metionina

<1-1> Eliminación de gen metB

15 Para eliminar el gen metB que codifica cistationina sintasa en la cepa de *E. coli*, se llevó a cabo una eliminación por PCR FRT de una etapa (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645). Los cebadores de la SEQ. ID NO: 1 y NO: 2 fueron usados para PCR usando el vector pKD3 (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645) como plantilla, dando como resultado la construcción de la casete de eliminación. La PCR se llevó a cabo como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto.

20 El producto de PCR fue sometido a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,0%, seguido de la purificación de ADN obtenido a partir de la banda de 1,2 kpb. El fragmento de ADN recuperado fue sometido a electroporación en *E. coli* (K12) W3110 transformado con vector pKD46 (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645). Antes de la electroporación, el W3110 transformado con pKD46 fue cultivado a 30°C en medio LB que contenía 100 µg/l de ampicilina y 5 mM de 1-arabinosa hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. A continuación, la cepa cultivada se lavó dos veces con agua esterilizada destilada y una vez más con glicerol al 10%. La electroporación se llevó a cabo a 2500 V. La cepa recuperada se llevó a una placa de medio LB que contenía 25 µg/l de cloranfenicol, seguido de cultivo a 37°C durante una noche. A continuación, se seleccionó una cepa que exhibía resistencia.

30 La PCR se llevó a cabo usando la cepa seleccionada como plantilla con los mismos cebadores indicados anteriormente y en las mismas condiciones. La eliminación del gen metB se identificó confirmando el gen de 1,2 kb de tamaño sobre el gel de agarosa al 1,0%. A continuación, la cepa fue transformada con vector pCP20 (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645) y se cultivó en medio LB. Se construyó una cepa final con metB bloqueado en la que el tamaño del gen metB se redujo hasta 150 pb sobre gel de agarosa al 1,0% mediante PCR en las mismas condiciones. Se confirmó que el marcador de cloranfenicol había sido eliminado. La cepa construida se denominó W3-B.

<1-2> Eliminación de gen thrB

40 Los inventores intentaron aumentar la síntesis de O-succinil homoserina a partir de homoserina por eliminación del gen thrB que codifica homoserina quinasa. Particularmente, cuando se usa una cepa productora de treonina, la eliminación de dicho gen fue bastante necesaria debido a que la actividad de uso de homoserina fue muy fuerte. Para la eliminación del gen thrB en la cepa W3-B construida antes, se llevó a cabo una eliminación con PCR de una etapa FRT del mismo modo descrito anteriormente para la eliminación de gen metB.

45 Para construir la casete de eliminación de thrB, se llevó a cabo una PCR usando un vector pKD4 (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645) como plantilla con cebadores de SEQ ID NO: 3 y NO: 4 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto. El producto de PCR se sometió a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,0%, seguido de purificación del ADN obtenido a partir de la banda de 1,6 kpb. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa W3-B transformada con vector pKD46. La cepa recuperada se llevó a placa de medio LB que contenía 50 µg/l de kanamicina, seguido de cultivo a 37°C durante una noche. A continuación, se seleccionó una cepa que exhibía resistencia.

55 La PCR se llevó a cabo usando la cepa seleccionada como plantilla con cebadores de SEQ ID NO: 3 y NO: 4 en las mismas condiciones indicadas anteriormente. La eliminación del gen ThrB fue identificada seleccionando la cepa

cuyo tamaño es 1,6 kb en gel de agarosa al 1,0%. A continuación, la cepa fue transformada con vector pCP20 y cultivada en medio LB. Se construyó una cepa final con thrB bloqueado en la que el tamaño del gen thrB se redujo hasta 150 kb sobre gel de agarosa al 1,0% mediante PCR en las mismas condiciones. Se confirmó que el marcador de canamicina había sido eliminado. La cepa construida se denominó W3-BT.

<1-3> Eliminación de gen metJ

Para la eliminación del gen metJ que es el gen regulador del gen metA implicado en la síntesis de precursor de metionina, se llevó a cabo una eliminación de PCR de una etapa FRT del mismo modo usado para la eliminación del gen metB.

Para construir la casete de eliminación de metJ, se llevó a cabo una PCR con los cebadores de SEQ ID NO: 5 y NO: 6 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto.

El producto de PCR se sometió a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,0%, seguido de purificación del ADN obtenido a partir de la banda de 1,2 kpb. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa W3-BT transformada con vector pKD46. La cepa recuperada se llevó a placa de medio LB que contenía cloranfenicol, seguido de cultivo a 37°C durante una noche. A continuación, se seleccionó una cepa que exhibía resistencia.

La PCR se llevó a cabo usando la cepa seleccionada como plantilla con cebadores de SEQ ID NO: 7 y NO: 8 en las mismas condiciones indicadas anteriormente. La eliminación del gen metJ fue identificada seleccionando la cepa cuyo tamaño es 1,6 kb en gel de agarosa al 1,0%. A continuación, la cepa fue transformada con vector pCP20 y cultivada en medio LB. Se construyó una cepa final con metJ bloqueado en la que el tamaño del gen metJ se redujo hasta 600 kb sobre gel de agarosa al 1,0% mediante PCR en las mismas condiciones. Se confirmó que el marcador de cloranfenicol había sido eliminado. La cepa construida se denominó W3-BTJ.

<1-4-1> Sobreexpresión de gen metA

Para aumentar la síntesis de precursor de metionina, se sobre-expresó el gen metA que codifica homoserina O-succinil transferasa implicada en la síntesis de O-succinil homoserina, el precursor de metionina.

Se llevó a cabo la PCR usando el cromosoma de *E. coli* w3110 como plantilla con los cebadores de las SEQ ID NO: 9 y NO: 10 como se indica a continuación; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El producto de PCR se sometió a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,0%, seguido de purificación del ADN obtenido a partir de la banda de 1,2 kpb. El fragmento de ADN recuperado fue ligado a otro fragmento de ADN obtenido del vector pCL1920 por digestión con SmaI. Se transformó la *E. coli* con el vector ligado, que a continuación fue cultivado en medio LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina, seguido de selección. El vector así construido se denominó pMetA-CL. En la Figura 3 se muestra el diagrama esquemático del pMetA-CL. La cepa W3-BTJ fue transformada con dicho vector. La cepa construida se denominó W3-BTJ/pMetA-CL y se observó un aumento del nivel de O-succinil homoserina en ella.

Como método adicional para aumentar la expresión de gen metA, el gen metA fue ligado al vector pCL1920 usando promotor CJ1 (CJ, Corea) y EcoRV. Se transformó la *E. coli* con el vector ligado, que a continuación fue cultivado en medio LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina, seguido de selección. El vector así construido fue denominado pCJ-MetA-CL. La cepa W3-BTJ fue transformada con dicho vector. La cepa construida se denominó W3-BTJ/pCJ-MetA-CL y se observó un aumento del nivel de O-succinil homoserina en ella.

<1-4-2> Sobreexpresión de gen metX

Para sintetizar O-acetil homoserina, el gen metX que codifica homoserina O-acetil transferasa implicado en la síntesis de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, fue sobreexpresado.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Leptospira meyeri* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 11 y NO: 12 como se indica a continuación; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El producto de PCR se sometió a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,0%, seguido de purificación del ADN obtenido a partir de la banda de 1,1 kpb. El fragmento de ADN recuperado fue ligado a vector pCL1920 usando promotor CJ1 y EcoRV. Se transformó *E. coli* con el vector ligado, que a continuación fue cultivado en medio LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina, seguido de selección. El vector así construido se denominó pCJ1-MetXlme-CL. La cepa W3-BTJ fue transformada con dicho vector. La cepa construida se denominó W3-BTJ/pCJ-MetXlme-CL y se observó un aumento en el nivel de O-acetil homoserina en ella.

Otro método para sobreexpresar el gen *metX* se realizó llevando a cabo una PCR que usa el cromosoma de *Corynebacterium* como plantilla con los cebadores de SEQ ID NO: 68 y NO: 69 como se indica a continuación; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El producto de PCR se sometió a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,0%, seguido de purificación de ADN. El fragmento de ADN recuperado se ligó a vector pCL1920 usando promotor CJ1 y EcoRV. Se transformó *E. coli* con el vector ligado, que a continuación fue cultivado en medio LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina, seguido de selección. El vector así construido se denominó pCJ-MetXcgl-CL. La cepa W3-BTj se transformó con dicho vector. La cepa construida se denominó W3-BTj/pCJ-MetXcgl-CL y se observó un aumento del nivel de O-acetil homoserina.

<1-4-3> Eliminación de gen *metA*

Para aumentar la producción de O-acetil homoserina, se eliminó el gen *metA* que codifica homoserina O-succinil transferasa en la cepa W3-BTJ. En base al descubrimiento de que solo la introducción de gen *metX* dio como resultado la acumulación de O-succinil homoserina, se esperaba que la eliminación del gen *metA* diera como resultado la promoción de la acumulación de O-acetil homoserina (Tabla 3). Para eliminar el gen *metA*, se llevó a cabo una PCR de una etapa FRT.

Para construir la casete de eliminación de *metA*, se llevó a cabo una PCR con los cebadores de SEQ ID NO: 70 y NO: 71 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto.

El producto de PCR se sometió a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,0%, seguido de purificación de ADN aislado a partir de la banda de 1,2 kpb. El fragmento de ADN recuperado fue sometido a electroporación en la cepa de *E. coli* W3-BTJ transformada con el vector pKD46. La cepa recuperada fue llevada a placa de metido LB que contenía cloranfenicol, seguido de cultivo a 37°C durante una noche. A continuación, se seleccionó una cepa que exhibía resistencia.

Se llevó a cabo una PCR usando la cepa seleccionada como plantilla con los cebadores de SEQ ID NO: 70 y NO: 71 en las mismas condiciones utilizadas antes. La eliminación del gen *metA* se identificó confirmando un gen de 1,1 kb de tamaño sobre gel de agarosa al 1,0%. A continuación, la cepa fue transformada con vector pCP20 y cultivada en medio LB. Se construyó una cepa final con *metA* bloqueado en la que el tamaño del gen *metA* se redujo hasta 100 kb sobre gel de agarosa al 1,0% mediante PCR en las mismas condiciones. Se confirmó que el marcador de cloranfenicol había sido eliminado. La cepa construida se denominó W3-BTJA. La cepa W3-BTJA fue transformada con el vector pCJ-MeTXlme-CL y la cepa resultante se denominó W3-BTJA/pCJ-MetX-CL. La cepa fue cultivada del mismo modo que se ha descrito anteriormente y como resultado no se observó acumulación de O-succinil homoserina, sino que la producción de O-acetil homoserina aumentó significativamente, aproximadamente en un 20%, en comparación con la W3-BTj.

<1-5> Conversión de cepa productora de L-treonina

Se construyeron cepas productoras de precursor de metionina del mismo modo que se describe en los Ejemplos <1-1> a <1-3> usando *E. coli* DJM002 (KCCM-10568), la cepa productora de L-treonina libre del requerimiento para metionina. Las cepas construidas fueron denominadas CJM-BTJ, CJM-BTJ/pMetA-CL y CJM-BTJ/pCJ-MetA-CL, respectivamente. También se construyó la cepa con gen *metA* bloqueado de la misma manera descrita en <1-4-3> usando la cepa CJM-BTJ y la cepa resultante se denominó CJM-BTJA.

Ejemplo 2: Fermentación para la producción de precursor de L-metionina

<2-1> Experimento de cultivo en matraz

Para investigar la capacidad de producción de precursor de metionina de la cepa construida en el Ejemplo 1, se llevó a cabo un cultivo en matraz Erlenmeyer. Se cultivaron W3-BTJ, CJM-BTJ y W3-BTJ transformados con vector de expresión de *metA* y *metX* en medio de placa LB que contenía espectinomicina a 31°C durante una noche. Se inoculó una única colonia en 3 mL de medio LB que contenía espectinomicina, seguido del cultivo a 31°C durante 5 horas. La disolución del cultivo se diluyó 1:200 en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL de medio de producción de precursor de metionina, seguido de cultivo a 31°C, 200 rpm durante 64 horas. Se llevó a cabo un análisis de HPLC para comparar con la capacidad de producción de precursor de metionina (Tabla 2 y Tabla 3). Como resultado, la capacidad de producción de metionina aumentó significativamente en la cepa productora de precursor de metionina preparada a partir de la cepa productora de L-treonina libre del requerimiento para metionina.

[Tabla 1]

Composición del medio de matraz para la producción de precursor de metionina	
Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	40 g
Sulfato de amonio	17 g
KH_2HPO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	5 mg
ZnSO_4	5 mg
Carbonato de calcio	30 g
Extracto de levadura	2 g
Metionina	0,15 g
Treonina	0,15 g

[Tabla 2]

Producción de precursor de metionina (O-succinil homoserina) mediante cultivo en matraz			
	DO	Consumo de glucosa (g/l)	O-succinil homoserina (g/l)
W3-BTJ	10	40	0,3
W3-BTJ/pMetA-CL	12	40	1,2
W3-BTJ/pCJ-MetA-CL	12	40	1,8
CJM-BTJ	5,0	33	0,6
CJM-BTJ/pMetA-CL	6,0	36	5,2
CJM-BTJ/pCJ-MetA-CL	6,0	40	10,1

5

[Tabla 3]

Producción de precursor de metionina (O-acetil homoserina) mediante cultivo en matraz			
	DO	Consumo de glucosa (g/l)	O-acetil homoserina (g/l)
W3-BTJ	10	40	0
W3-BTJ/pCJ-MetXlme-CL	12	40	1,5
W3-BTJ/pCJ-MetXcgl-CL	12	40	1,4
W3-BTJA/pCJ-metXlme-CL	11	40	1,8
CJM-BTJ	5,0	33	0
CJM-BTJ/pCJ-metXlme-CL	5,5	40	4,8
CJM-BTJ/pCJ-MetXcgl-CL	6,0	36	4,6
CJM-BTJA/pCJ-metX-CL	5,8	40	6,5

<2-2> Fermentación a gran escala

- Se seleccionó una cepa que exhibe la mayor capacidad de producción de precursor de metionina del Ejemplo 1 para producir en masa precursor de metionina, que a continuación se cultivó en un fermentador de 5 L. Se inoculó CJM-BTJ/pCJ-metA-CL o CJM-BTJA/pCJ-metXlme-CL en medio LB que contiene espectinomycin, seguido de cultivo a 31°C durante una noche. A continuación, se inoculó una única colonia en 10 mL de medio LB que contenía espectinomycin, que se cultivó a 31°C durante 5 horas. La disolución de cultivo se diluyó 1:100 en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL que contenía 200 mL de medio de siembra de precursor de metionina, seguido de cultivo a 31°C, 200 rpm durante 3 – 10 horas. La disolución de cultivo fue inoculada en un fermentador de 5 L, seguido de un cultivo adicional durante 50 – 100 horas mediante fermentación semicontinua. La concentración de precursor de metionina en la disolución fermentada se midió mediante HPLC y los resultados se muestran en la Tabla 5.

[Tabla 4]

Composición de medio de fermentador para la producción de precursor de metionina			
Composición	Medio de siembra	Medio principal	Medio alimentado
Glucosa (g/l)	10,1	40	600
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/l)	0,5	4,2	
Extracto de levadura (g/l)	10	3,2	
KH ₂ PO ₄	3	3	8
Sulfato de amonio (g/l)		6,3	
NH ₄ Cl (g/l)	1		
NaCl (g/l)	0,5		
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (g/l)	5,07		
DL-Metionina (g/l)		0,5	0,5
L-Isoleucina (g/l)	0,05	0,5	0,5
L-Treonina (g/l)		0,5	0,5

[Tabla 5]

Producción de precursor de metionina en un fermentador		
	O-succinil homoserina (g/l)	O-acetil homoserina (g/l)
CJM-BTJ/pCJ-MetA-CL	>80	0
CJM-BTJA/pCJ-MetXIme-CL	0	>55

5 Ejemplo 3: Producción de enzima convertidora de metionina

<3-1> Cistationina gamma sintasa derivada de *E. coli*

10 Se clonó el gen metB que codifica cistationina gamma sintasa derivada de *E. coli*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina u O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *E. coli* como plantilla con los cebadores de SEQ ID NO: 13 y NO: 14 como se indica a continuación; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

15 El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NcoI/HindIII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ-Corea) digerido con las mismas enzimas. El vector resultante fue denominado pCJ-MetB-CL y en la Figura 4 se muestra el diagrama esquemático. Se transformó *E. coli* W3110 con el vector clonado y a continuación se cultivó en medio de placa LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina, seguido de selección de colonia. La colonia seleccionada fue inoculada en 20 3 mL de medio LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina, seguido de cultivo a 37°C durante una noche. Las células de cultivo fueron recuperadas, lavadas con tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,5), suspendidas en 200 µL de tampón de fosfato potásico, y lisadas con ultrasonidos 5 veces a intervalos de 30 segundos. El lisato celular se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos y se obtuvo el sobrenadante para cuantificar el nivel total de proteína usando una disolución de cuantificación de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad, EE.UU.). La expresión de proteínas se identificó mediante SDS-PAGE. El sobrenadante obtenido del extracto celular se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-2> O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Pseudomonas* sp.

30 Se clonó el gen metZ que codifica O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Pseudomonas* sp., que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina. Como microorganismos *Pseudomonas* sp., se usaron la *Pseudomonas aeruginosa* y la *Pseudomonas putida*.

35 Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de cada cepa como plantilla con los cebadores de SEQ ID NO: 15 y NO: 16 para la *Pseudomonas aeruginosa* y los cebadores de SEQ ID NO: 17 y NO: 18 para la *Pseudomonas putida* como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

40 El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/PacI y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <1-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-3> O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Pseudomonas* sp.

Se clonó el gen metY que codifica O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Pseudomonas* sp., que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Pseudomonas aeruginosa* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 19 y NO: 20 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/PacI y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-4> Cistationina sintasa derivada de *Corynebacterium glutamicum*

Se clonó el gen metB que codifica cistationina sintasa derivada de *Corynebacterium glutamicum*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Corynebacterium glutamicum* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 21 y NO: 22 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NcoI/HindIII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-5> O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Corynebacterium glutamicum*

Se clonó el gen metZ que codifica O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Corynebacterium glutamicum*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Corynebacterium glutamicum* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 23 y NO: 24 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-6> O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Leptospira* sp.

Se clonó el gen metY que codifica O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Leptospira meyeri*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Leptospira meyeri* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 25 y NO: 26 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-7> O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Saccharomyces* sp.

Se clonó el gen met25 que codifica O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Saccharomyces cerevisiae*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Saccharomyces cerevisiae* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 27 y NO: 28 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/PacI y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-8> O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Chromobacterium* sp.

Se clonó el gen metZ que codifica O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Chromobacterium violaceum*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Chromobacterium violaceum* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 29 y NO: 30 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-9> O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Nocardia* sp.

Se clonó el gen metZ que codifica O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Nocardia farcinica*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Nocardia farcinica* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 31 y NO: 32 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-10> O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Bradyrhizobium* sp.

Se clonó el gen metZ que codifica O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Bradyrhizobium japonicum*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Bradyrhizobium japonicum* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 33 y NO: 34 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-11> O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Hyphomonas* sp.

Se clonó el gen metZ que codifica O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Hyphomonas neptunium*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Hyphomonas neptunium* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 35 y NO: 36 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con BamHI/HindIII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-12> O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Methylococcus* sp.

Se clonó el gen metZ que codifica O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Methylococcus capsulatus*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Methylococcus capsulatus* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 37 y NO: 38 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

5 <3-13> O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Methylobacillus* sp.

Se clonó el gen metZ que codifica O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Methylobacillus flagellatus*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

10 Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Methylobacillus flagellatus* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 39 y NO: 40 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

15 El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

20 <3-14> O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Nitrosomonas* sp.

Se clonó el gen metZ que codifica O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Nitrosomonas europaea*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

25 Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Nitrosomonas europaea* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 41 y NO: 42 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

30 El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-15> Cistationina sintasa derivada de *Klesiella* sp.

35 Se clonó el gen metB que codifica cistationina sintasa derivada de *Klesiella pneumoniae*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

40 Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Klesiella pneumoniae* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 43 y NO: 44 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

45 El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-16> Cistationina sintasa derivada de *Bacillus* sp.

50 Se clonó el gen metB que codifica cistationina sintasa derivada de *Bacillus subtilis*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Bacillus subtilis* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 45 y NO: 46 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

55 El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-17> Cistationina sintasa derivada de *Shigella* sp.

60 Se clonó el gen metB que codifica cistationina sintasa derivada de *Shigella flexneri* 2457T, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

65 Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Shigella flexneri* 2457T como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 47 y NO: 48 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

5 <3-18> Cistationina sintasa derivada de *Colwellia* sp.

Se clonó el gen metB que codifica cistationina sintasa derivada de *Colwellia psychrerythraea*, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

10 Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Colwellia psychrerythraea* como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 49 y NO: 50 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

15 El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-19> Cistationina sintasa derivada de *Salmonella* sp.

20 Se clonó el gen metB que codifica cistationina sintasa derivada de *Salmonella entérica serovar paratyphi* A, que se usaría para la conversión de O-succinil homoserina o de O-acetil homoserina, el precursor de metionina, en metionina.

25 Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Salmonella entérica serovar paratyphi* A como plantilla y los cebadores de SEQ ID NO: 51 y NO: 52 como se indica a continuación; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, maduración a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos.

30 El fragmento de ADN obtenido fue digerido con NdeI/AvrII y clonado en vector pCL-CJ1 (CJ, Corea) digerido con las mismas enzimas. Se obtuvo el sobrenadante del extracto celular usando el vector clonado del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo <3-1> y se usó para la reacción de conversión enzimática.

<3-20> Comparación de las actividades de las enzimas convertidoras usando OSHS como sustrato.

35 Se comparó la actividad de cada una de las disoluciones enzimáticas obtenidas en los Ejemplos <3-1> a <3-19> para seleccionar la enzima convertidora de metionina óptima.

40 En primer lugar, se disolvió O-succinil homoserina (Sigma, EE.UU.) en tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,5) a una concentración de 3 mM. Se añadió piridoxal 5'-fosfato (Sigma, EE.UU.) usado como co-enzima a la disolución de reacción a una concentración final de 10 µM. Se añadió metil mercaptano (Metil mercaptano, Tokyo Kasei Organic Chemicals, Japón), usado como sustrato adicional, a la disolución de reacción a una concentración final de 2 mM. Se colocó 1 mL de disolución de reacción a 37°C, a la cual se añadieron 10 µL de cada disolución de enzima (concentración de proteína: 5 mg/mL). Se recolectaron 100 µL de la disolución de reacción cada 5 – 10 minutos y se añadieron a 900 µL de disolución de DTNB (Sigma, EE.UU.) de 4 mg/mL. Se midió la DO₄₁₅ para confirmar el avance de la reacción.

45 Se hizo reaccionar el DTNB con el grupo SH del metilmercaptano que quedaba en la disolución de reacción y se sintetizó así una sustancia amarilla. Por tanto, el avance o no de la reacción se comprobó observando la desaparición del color amarillo de la disolución de reacción resultante de la reacción de conversión de metilmercaptano en metionina.

50 Tal como se muestra en la Figura 5, se demuestra que la O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Chromobacterium* sp., la O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Norcardia* sp., la O-succinil homoserina sulfhidrilasa y la O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivadas de *Pseudomonas* sp. presentan elevadas actividades enzimáticas. Otras enzimas también mostraron algún grado de actividad, pero sus velocidades de reacción fueron relativamente bajas. La reactividad de cada enzima con el sustrato se recoge en la Tabla 6. Tras completar la reacción de una hora, se llevó a cabo un análisis de HPLC para confirmar las producciones finales de metionina y ácido succínico. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

<3-21> Comparación de las actividades de las enzimas convertidoras usando OAHS como sustrato

60 El experimento se llevó a cabo con O-acetil homoserina de la misma manera descrita en el Ejemplo <3-20>. La O-acetil homoserina se purificó a partir del sobrenadante de la disolución fermentada. Para la reacción se usaron las mismas disoluciones de reacción y disoluciones enzimáticas usadas para el experimento con O-succinil homoserina. Tal como se muestra en la Figura 6, se demostró que la O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Hypomononas* sp., la O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Pseudomonas* sp., la O-succinil homoserina sulfhidrilasa de *Chromobacterium* sp. y la O-succinil homoserina derivada de *Leptospira* sp., presentan elevadas

actividades enzimáticas. Otras enzimas también mostraron algún grado de actividad, pero sus velocidades de reacción fueron relativamente bajas. En la Tabla 6 se presentan las reactividades de cada enzima con cada sustrato. Tras completar una hora de reacción, se aplicó análisis de HPLC para confirmar las producciones finales de metionina y ácido succínico. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

5

[Tabla 6]

Reacción de conversión de O-succinil homoserina y O-acetil homoserina mediante enzimas derivadas de cada cepa				
Cepa	Nº de cepa (ATCC)	Gen (KEGG)	Especificidad de sustrato	
			OSH	OAH
<i>Escherichia coli</i> K12	55151	MetB	+	+
<i>Pseudomonas aurogenosa</i>	17933	MetZ	+++	+
		MetY	++++	++++
<i>Pseudomonas putida</i>	17390	MetZ	++++	+
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	13032	MetB	+	+
		MetY	+	+
<i>Leptospira meyeri</i>	43278	MetY	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2704	Met25	+	+
<i>Chromobacterium violaceum</i>	12472	MetZ	++++	+++
<i>Nocardia farcinica</i>	3318	MetZ	++++	+
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	10324	MetZ	+	+
<i>Hyphomonas neptunium</i>	49408	MetZ	+	++++
<i>Methylococcus capsulatus</i>	19069D-5	MetZ	+	+
<i>Methylobacillus flagellatus</i>	51484D	MetZ	+	+
<i>Nitrosomas europaea</i>	19718D	MetZ	+	+
<i>Klesiella pneumoniae</i>	25955	MetB	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	10783	MetB	+	+
<i>Shigella flexneri</i> 2475T	700930D-5	MetB	+	+
<i>Cowwellia psychrerythraea</i>	BAA-618D	MetB	+	+
<i>Salmonella entérica serovar paratyphi A</i>	9150D	MetB	+	+

[Tabla 7]

Capacidad de producción de metionina y ácido succínico a partir de O-succinil homoserina para cada enzima		
Enzima, gen	Cantidad de metionina (g/l)	Cantidad de ácido succínico (g/l)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> , metB	0,05	0,03
<i>Escherichia coli</i> , metB	0,14	0,1
<i>Nocardia farcinica</i> , metZ	0,21	0,17
<i>Pseudomonas putida</i> , metZ	0,22	0,17
<i>Pseudomonas aurogenosa</i> , metZ	0,22	0,17
<i>Chromobacterium violaceum</i>	0,22	0,17
<i>Pseudomonas aurogenosa</i> , metY	0,21	0,17

10

[Tabla 8]

Producción de metionina y ácido acético a partir de O-acetil homoserina para cada enzima		
Enzima, gen	Cantidad de metionina (g/l)	Cantidad de ácido acético (g/l)
<i>Pseudomonas aurogenosa</i> , metY	0,22	0,081
<i>Chromobacterium violaceum</i> , metZ	0,18	0,068
<i>Hyphomonas neptunium</i> , metZ	0,22	0,082
<i>Corynebacterium glutamicum</i> , metY	0,05	0,015
<i>Leptospira meyeri</i> , metY	0,15	0,05

<3-22> Identificación de la inhibición de retroalimentación para enzima convertidora

La inhibición de retroalimentación fue identificada en presencia o en ausencia de metionina del mismo modo descrito en los Ejemplos <3-20> y <3-21>. Las disoluciones de reacción fueron preparadas de la misma manera indicada anteriormente y se llevó a cabo la misma reacción añadiendo o no 5 g/l de metionina en cada reacción de disolución. Se asignó un 100% a la velocidad de reacción de la disolución de reacción sin metionina, y la actividad remanente en presencia de metionina se calculó como un % en base a ésta. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Como resultado, la actividad de la O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Pseudomonas* sp., la O-succinil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Nocardia* sp. y la O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de *Leptospira* sp. fueron inhibidas por la metionina, lo que sugiere que dichas actividades enzimáticas fueron inhibidas por el sistema de retroalimentación en presencia de metionina. Se usaron enzimas sin sistema de retroalimentación en reacciones adicionales. Se asumió que la enzima era inhibida por el sistema de retroalimentación en la realización anterior para uso en la misma reacción cuando se usó una cepa mutante libre de sistema de retroalimentación.

[Tabla 9]

Inhibición de la actividad enzimática por metionina		
Enzima, gen	Actividad remanente (%)	
	OSHS	OAHS
<i>Chromobacterium violaceum</i> , metZ	97	100
<i>Pseudomonas aurogenosa</i> , metY	54	53
<i>Nocardia farcinica</i> , metZ	68	
<i>Pseudomonas putida</i> , metZ	98	
<i>Pseudomonas aurogenosa</i> , metZ	98	
<i>Leptospira meyeri</i> , metY		45
<i>Hyphomonas neptunium</i> , metZ		100

<3-23> Comparación de homología entre las enzimas convertidoras

Se comparó la homología entre enzimas convertidoras usadas la reacción de conversión para investigar las interacciones de la reactividad frente a O-succinil homoserina y O-acetil homoserina y la inhibición de retroalimentación.

A partir de la comparación de la homología entre las enzimas convertidoras usadas en el presente documento, se confirmó que la homología entre los metZs que codifican O-succinil homoserina sulfhidrilasa y la homología entre los metYs que codifican O-acetil homoserina sulfhidrilasa fueron superiores a la homología entre los metZs y los metYs. En relación con la anterior realización, existen muchos casos de metZ que codifica O-succinil homoserina sulfhidrilasa que no exhibe la inhibición de retroalimentación. Sin embargo, se identificó que el metY que codifica O-acetil homoserina sulfhidrilasa era inhibido por el sistema de retroalimentación relativamente elevada, debido a que todas las enzimas usadas en los ejemplos fueron inhibidas por retroalimentación. Respecto a la selectividad a la O-succinil homoserina y la O-acetil homoserina, el grupo de gen metZ presentó una elevada selectividad a la O-succinil homoserina, mientras que el grupo de gen metY presentó una elevada selectividad a O-acetil homoserina. Entre medias, el metY derivado de *Pseudomonas putida* y el metZ derivado de *Chromobacterium violaceum* presentaron una reactividad específicamente elevada para ambos sustratos.

Las secuencias de aminoácidos de todas las enzimas usadas en el presente documento fueron alineadas mediante el programa Clustal W (DNASTar). Como resultado, todas ellas presentaron los dominios representados por las siguientes secuencias. Por lo tanto, las enzimas que presentan los siguientes dominios pueden producir metionina de la misma manera.

Dominio 1: Y-(S, I, T, V)-R-X-X-(N,S)

Dominio 2:

(V,A,I)-(V,L,I)-D-N-X-(F,V,M,I)-X-(T,S)-(P,A)-X-(L,I)-(Q,C,V)-X-(P,G)-(L,F)-X-(L,M,H)-G-(A,V)-(D,H)

Dominio 3:

(S,A,G,P)-(P,A,V)-F-(N,D)-(A,S)-(W,F,Y)-X-X-X-(K,W,R,S)-G-(L,M,V,I,M)-(E,K,D,R)-T-(L,M)-

Dominio 5: (H,Y)-(P,A)-(A,S)-(T,S)-(T,M,Q)-(T,S)-H

Dominio 6: (V,I,L)-R-(V,I,L,F)-(S,A)-(V,I,T)-G-(L,I)-E-

Ejemplo 4: Reacción de conversión de metionina mediante enzima convertidora<4-1> Producción en masa de enzima convertidora

- 5 Para producir en masa la cepa productora de enzima convertidora de metionina construida en el Ejemplo 2 (2-2 a 2-8), la cepa se cultivó en un fermentador de 1 L. Se transformó una cepa (W3110) con vector de expresión metZ derivado de *Pseudomonas* sp. o vector de expresión de metZ derivado de *Hyphomonas* sp. Las cepas transformadas fueron inoculadas sobre medio de placa LB que contenía espectinomicina, seguido de cultivo a 30 – 40°C durante una noche. La única colonia obtenida fue inoculada en 40 mL de medio LB que contenía
- 10 espectinomicina, seguido de cultivo a 30 – 40°C durante 5 horas. La cepa cultivada que expresa metZ derivada de *Pseudomonas* sp. y la cepa cultivada que expresa metZ derivada de *Hyphomonas* sp. fueron cultivadas en un fermentador de 1 L a 30 – 40°C, 600 – 900 rpm durante 15 – 30 horas. En la Tabla 10 se muestra la composición del medio de cultivo.
- 15 La disolución de enzima convertidora de metionina se preparó homogeneizando células de la disolución fermentada usando ultrasonidos.

[Tabla 10]

Composición del medio para la producción de enzima convertidora	
Composición de medio 2XYT	
Extracto de levadura (g/l)	10
Triptófano (g/l)	16
Glucosa (g/l)	40
Espectinomicina (g/l)	50

20 <4-2> Reacción de conversión de metionina

- La reacción de conversión de metionina se llevó a cabo usando disolución de enzima convertidora de O-succinil homoserina derivada de *Pseudomonas* sp. y disolución de enzima convertidora de O-acetil homoserina derivada de *Hyphomonas* sp. preparadas en el Ejemplo 4 (4-1), respectivamente en la disolución de fermentación de O-succinil homoserina y O-acetil homoserina preparadas en el Ejemplo 2 (2-2).
- 25

- Se añadieron 0,1 L de disolución de cultivo enzimático de células lisadas a 2,0 L de disolución de fermentación de precursor de metionina que no eliminó la célula, al cual se añadieron 0,3 L de Na-metilmercaptano al 15% para iniciar la reacción. Dos horas después, la disolución de fermentación se recuperó y las células fueron eliminadas. Se
- 30 llevó a cabo un análisis de HPLC para confirmar la producción de metionina. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

[Tabla 11]

	L-metionina	Ácido succínico	Ácido acético
	(g/l)	(g/l)	(g/l)
Disolución de fermentación de O-succinil homoserina (>80 g/l)	>42	>33	0
Disolución de fermentación de O-acetil homoserina (>55 g/l)	>40	0	>15

- 35 Como resultado, mientras que en el método convencional la L-metionina se produce a una baja concentración, de hasta 10 g/l, con el método de la presente invención se puede producir L-metionina a gran escala a concentraciones de hasta 30 g/l.

40 Aplicabilidad industrial

- El método de la invención permite la producción selectiva de L-metionina, que es superior a la síntesis química convencional que produce D-metionina y L-metionina juntas, y la producción de ácidos orgánicos tales como ácido succínico o ácido acético como subproductos sin ningún proceso independiente adicional.

45 <110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

<120> Microorganismo productor de precursor de L-metionina y método para producir L-metionina y ácido orgánico usando el precursor de L-metionina

50 <130> 69.67.98072/01

	<150> EP 07793305:9		
	<151> 30-07-2007		
5	<150> PGT/KR2007/003650		
	<151> 30-07-2007		
	<150> KR 10-2006-0071581		
	<151> 28-07-2006		
10	<150> KR 10-2007-0076045		
	<151> 27-07-2007		
	<160> 71		
15	<170> KopatentIn 1.71		
	<210> 1		
	<211> 70		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador para la amplificación de cloranfenicol		
25	<400> 1		
	ttactctggt gcctgacatt tcacccgacaa agcccagggg acttcacac gtgtaggctg	60	
	gagctgcttc	70	
30	<210> 2		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> cebador para la amplificación de cloranfenicol		
	<400> 2		
	ttaccccttg ttgcagccc ggaagccatt ttccaggctg gcaattaaat catatgaata	60	
40	tcctccttag	70	
	<210> 3		
	<211> 70		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador para la amplificación de kanamicina		
50	<400> 3		
	aaagaatatg ccgatcggtt cgggcttagg ctccagtgcc tgttcgggtg gtgtaggctg	60	
	gagctgcttc	70	
	<210> 4		
55	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 595 453 T3

	<220>		
	<223> cebador para la amplificación de kanamicina		
	<400> 4		
5			
	agacaaccca catcgctttc aacattggcg accggagccg ggaaggcaaa catatgaata	60	
	tcctccttag	70	
	<210> 5		
	<211> 71		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
15	<223> cebador para la amplificación de cloranfenicol		
	<400> 5		
	atggctgaat ggagcggcga atatcagc ccatacgtg agcacggcaa ggtgtaggct	60	
	ggagctgctt c	71	
20	<210> 6		
	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador para la amplificación de cloranfenicol		
	<400> 6		
	gtattcccaac gtctccgggt taatccccaat ctcaagcatg atctccatat gaatatcctc	60	
30	cttag	65	
	<210> 7		
	<211> 19		
	<212> ADN		
35	<213> <i>Escherichia coli</i>		
	<400> 7		
	gggctttgtc ggtgaaatg 19		
40	<210> 8		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> <i>Escherichia coli</i>		
45	<400> 8		
	actttgcgat gagcgagag 19		
	<210> 9		
	<211> 28		
50	<212> ADN		
	<213> <i>Escherichia coli</i>		
	<400> 9		
55	aatggatcct gccgtgagcg gcgaatac 28		
	<210> 10		
	<211> 28		
	<212> ADN		

<213> *Escherichia coli*
 <400> 10
 agctctagac tgctgaggta cgttcgg 28
 5
 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Leptospira meyeri*
 10
 <400> 11
 catatgccta cctccgaaca gaa 23
 15
 <210> 12
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Leptospira meyeri*
 20
 <400> 12
 aagctttcaa aggaaaactc ctctgt 26
 25
 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 13
 gagatatacc atggtgacgc gtaaacaggc cac 33
 30
 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 35
 <400> 14
 ccgcaagctt ttaccctt gttgcagcc 30
 40
 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 45
 <400> 15
 ggaattccat atgactcagg actgggatgc 30
 50
 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 16
 ccttaattaa tcacagcgcg gccagcc 27
 55
 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas putida*
 60
 <400> 17
 ggaattccat atgacggatc aatgggatgc 30
 65
 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas putida*

	<400> 18 ccttaattaa tcacaatgcc gccagcc	27
5	<210> 19 <211> 29 <212> ADN <213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
10	<400> 19 ggaattccat atgaagctgg aaacgcttg	29
15	<210> 20 <211> 28 <212> ADN <213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
20	<400> 20 ccttaattaa tcagccgagg ctggcctc	28
25	<210> 21 <211> 29 <212> ADN <213> <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
30	<400> 21 cgcaggccat ggtgtctttt gacccaaac	29
35	<210> 22 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
40	<400> 22 ccgccgaagc ttctaaaggt tattgag	27
45	<210> 23 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
50	<400> 23 agtcgtcata tgccaaagta cgacaattcc	30
55	<210> 24 <211> 31 <212> ADN <213> <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
60	<400> 24 ctggcaccta ggctagattg cagcaaagcc g	31
65	<210> 25 <211> 28 <212> ADN <213> <i>Leptospira meyeri</i>	
	<400> 25 agtcgtcata tggtaggacc atcggggg	28
	<210> 26 <211> 38 <212> ADN <213> <i>Leptospira meyeri</i>	
	<400> 26 ctggcaccta ggtatcaga tattttttaa tgcctott	38

5 <210> 27
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <400> 27
 ggaattccat atgcatctc atttcgat 28

 10 <210> 28
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 15 <400> 28
 ccttaattaa tcatggtttt tggccagc 28

 20 <210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Chromobacterium violaceum*

 25 <400> 29
 catatggcat ccgacgcgcc g 21

 30 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Chromobacterium violaceum*

 <400> 30
 cctaggttag tcaaggcccc gcaa 24

 35 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Nocardia farcinica*

 40 <400> 31
 catatggtga tcaccggcgg cgcg 24

 45 <210> 32
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Nocardia farcinica*

 <400> 32
 cctaggtcag ctcagcgct gctc 24

 50 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Bradyrhizobium Japonicum*

 55 <400> 33
 catatggtgg atatatccag gccg 24

 60 <210> 34
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Bradyrhizobium Japonicum*

 65 <400> 34
 cctaggtcac gccttcca gcgc 24

 <210> 35

<211> 25
 <212> ADN
 <213> *Hyphomonas Neptunium*
 5 <400> 35
 ggatccgatg gcggatgcac ccggc 25

 <210> 36
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> *Hyphomonas Neptunium*

 <400> 36
 15 aagctttcac aagctgttaa gcga 24

 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> *Methylococcus Capsulatus*

 <400> 37
 catatggaga cccggggccgt g 21

 <210> 38
 25 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Methylococcus Capsulatus*

 <400> 38
 30 cctaggtcag gcgaagcgag cca 23

 <210> 39
 <211> 25
 <212> ADN
 35 <213> *Methylobacillus Flagellatus*

 <400> 39
 catatgagtc agcatgaatg gcatg 25

 40 <210> 40
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Methylobacillus Flagellatus*

 45 <400> 40
 cctaggagtc agcatgaatg gcatg 25

 <210> 41
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> *Nitrosomonas Europaea*

 <400> 41
 55 catatgacga acgatctgga tc 22

 <210> 42
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> *Nitrosomonas Europaea*

 <400> 42
 cctagggtat tgcaatccgc gagca 25

 <210> 43
 65 <211> 23
 <212> ADN

	<213> <i>Klesiella pneumoniae</i>	
5	<400> 43 catatgacgc gtaaacaggc cac	23
	<210> 44 <211> 25 <212> ADN <213> <i>Klesiella pneumoniae</i>	
10	<400> 44 cctaggttat tcctcgttg ctgcc	25
15	<210> 45 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Bacillus subtilis</i>	
20	<400> 45 catatgtcac agcacgttga aac	23
25	<210> 46 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Bacillus subtilis</i>	
30	<400> 46 cctaggttac tcaaatgaaa cagctcc	27
	<210> 47 <211> 24 <212> ADN <213> <i>Shigella flexneri</i> 2457T	
35	<400> 47 catatgacgc gtaaacaggc cacc	24
40	<210> 48 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Shigella flexneri</i> 2457T	
45	<400> 48 cctaggttac ccctgtttg cagcccg	27
50	<210> 49 <211> 33 <212> ADN <213> <i>Colwellia Psychrerythraea</i>	
	<400> 49 catatgtcga ttactaaaaa aggtaatt acc	33
55	<210> 50 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Colwellia Psychrerythraea</i>	
60	<400> 50 cctaggttac agttggctct gcgttaaacc	30
65	<210> 51 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi A	

<400> 51
catatgacgc gtaaacagcg cac 23

5 <210> 52
<211> 27
<212> ADN
<213> *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A

10 <400> 52
cctagggtac ccctgttg cagcccg 27

15 <210> 53
<211> 403
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 53

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

Ile Ala Ala Leu Ala Glu Ile Ala His Ala Lys Gly Ala Leu Leu Ala
180 185 190

Val Asp Asn Cys Phe Cys Thr Pro Ala Leu Gln Gln Pro Leu Lys Leu
195 200 205

Gly Ala Asp Val Val Ile His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Asp Gly Gln
210 215 220

Gly Arg Gly Met Gly Gly Val Val Ala Gly Arg Gly Glu Gln Met Lys
225 230 235 240

Glu Val Val Gly Phe Leu Arg Thr Ala Gly Pro Thr Leu Ser Pro Phe
245 250 255

Asn Ala Trp Leu Phe Leu Lys Gly Leu Glu Thr Leu Arg Ile Arg Met
260 265 270

Gln Ala His Ser Ala Ser Ala Leu Ala Leu Ala Glu Trp Leu Glu Arg
275 280 285

Gln Pro Gly Ile Glu Arg Val Tyr Tyr Ala Gly Leu Gln Ser His Pro
290 295 300

Gln His Glu Leu Ala Arg Arg Gln Gln Ser Gly Phe Gly Ala Val Val
305 310 315 320

Ser Phe Asp Val Lys Gly Gly Arg Asp Ala Ala Trp Arg Phe Ile Asp
325 330 335

Ala Thr Arg Met Val Ser Ile Thr Thr Asn Leu Gly Asp Thr Lys Thr
340 345 350

Thr Ile Ala His Pro Ala Thr Thr Ser His Gly Arg Leu Ser Pro Glu
355 360 365

Asp Arg Ala Arg Ala Gly Ile Gly Asp Ser Leu Ile Arg Val Ala Val
370 375 380

Gly Leu Glu Asp Leu Asp Asp Leu Lys Ala Asp Met Ala Arg Gly Leu
385 390 395 400

Ala Ala Leu

<210> 54
<211> 403
<212> PRT
<213> *Pseudomonas putida*
<400> 54

Met	Thr	Asp	Gln	Trp	Asp	Ala	Gly	Arg	Leu	Asp	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Val	Gly	Phe	Asp	Thr	Leu	Ala	Val	Arg	Ala	Gly	Gln	His	Arg	Thr	Pro
			20					25					30		
Glu	Gly	Glu	His	Ser	Glu	Ala	Leu	Phe	Leu	Thr	Ser	Ser	Tyr	Val	Phe
		35					40					45			
Arg	Thr	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Ala	Gly	Glu	Thr	Pro	Gly
	50					55					60				

Asn	Val	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Thr	Asn	Pro	Ser	Val	Arg	Ala	Phe	Glu	Glu	65	70	75	80
Arg	Leu	Ala	Ala	Met	Glu	Gly	Ala	Glu	Gln	Ala	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	85	90	95	
Gly	Met	Ala	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Val	Met	Ser	Leu	Cys	Ser	Ala	Gly	100	105	110	
Asp	His	Val	Leu	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Phe	Gly	Ser	Thr	Ile	Ser	Leu	115	120	125	
Phe	Glu	Lys	Tyr	Phe	Lys	Arg	Phe	Gly	Val	Gln	Val	Asp	Tyr	Val	Pro	130	135	140	
Leu	Val	Asp	Leu	Ala	Gly	Trp	Glu	Lys	Ala	Ile	Lys	Ala	Asn	Thr	Arg	145	150	155	160
Leu	Leu	Ile	Val	Glu	Ser	Pro	Ser	Asn	Pro	Leu	Ala	Glu	Leu	Val	Asp	165	170	175	
Ile	Thr	Ala	Leu	Ser	Glu	Ile	Ala	His	Ala	His	Gly	Ala	Met	Leu	Val	180	185	190	
Val	Asp	Asn	Cys	Phe	Ser	Thr	Pro	Ala	Leu	Gln	Gln	Pro	Leu	Lys	Leu	195	200	205	
Gly	Ala	Asp	Ile	Val	Phe	His	Ser	Ala	Thr	Lys	Phe	Ile	Asp	Gly	Gln	210	215	220	
Gly	Arg	Cys	Met	Gly	Gly	Val	Val	Ala	Gly	Arg	Ala	Glu	Gln	Met	Lys	225	230	235	240
Glu	Val	Val	Gly	Phe	Leu	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Phe	245	250	255	
Asn	Ala	Trp	Ile	Phe	Thr	Lys	Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Met	260	265	270	
Arg	Ala	His	Cys	Glu	Ser	Ala	Gln	Ala	Leu	Ala	Glu	Trp	Leu	Glu	Gln	275	280	285	
Gln	Asp	Gly	Val	Glu	Lys	Val	His	Tyr	Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	290	295	300	
Gln	His	Ala	Leu	Ala	Lys	Arg	Gln	Met	Ser	Gly	Phe	Gly	Ala	Val	Val	305	310	315	320
Ser	Phe	Glu	Val	Lys	Gly	Gly	Lys	Glu	Gly	Ala	Trp	Arg	Phe	Ile	Asp	325	330	335	
Ala	Thr	Arg	Val	Ile	Ser	Ile	Thr	Thr	Asn	Leu	Gly	Asp	Ser	Lys	Thr	340	345	350	
Thr	Ile	Ala	His	Pro	Ala	Thr	Thr	Ser	His	Gly	Arg	Leu	Ser	Pro	Gln	355	360	365	
Glu	Arg	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Arg	Asp	Ser	Leu	Ile	Arg	Val	Ala	Val	370	375	380	
Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Ala	Asp	Leu	Gln	Ala	Asp	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	385	390	395	400

Ala Ala Leu

5	<210> 55
	<211> 425
	<212> PRT
	<213> <i>Pseudomonas putida</i>
10	<400> 55

Met	Lys	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Phe	Ser	Pro	Asp	Pro	1	5	10	15
Thr	Thr	Lys	Ala	Val	Ala	Val	Pro	Ile	Tyr	Gln	Thr	Thr	Ser	Phe	Ala	20	25	30	
Phe	Asp	Asp	Thr	Gln	His	Gly	Ala	Asp	Leu	Phe	Asp	Leu	Lys	Val	Ala	35	40	45	
Gly	Asn	Ile	Tyr	Ser	Arg	Ile	Met	Asn	Pro	Thr	Asn	Asp	Val	Leu	Glu	50	55	60	
Gln	Arg	Met	Ala	Ala	Leu	Glu	Gly	Gly	Val	Gly	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	65	70	75	80
Ser	Gly	Met	Ala	Ala	Ile	Thr	Tyr	Ala	Ile	Gln	Thr	Val	Ala	Glu	Ala	85	90	95	
Gly	Asp	Asn	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Leu	Tyr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Asn	100	105	110	
Leu	Leu	Ala	His	Thr	Leu	Pro	Arg	Met	Gly	Ile	His	Thr	Arg	Phe	Ala	115	120	125	
Ala	His	Asp	Asp	Ile	Ala	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Ile	Asp	Ala	Arg	Thr	130	135	140	
Lys	Ala	Val	Phe	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asn	Pro	Ala	Gly	Asn	Ile	Val	145	150	155	160
Asp	Ile	Ala	Ala	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	His	Arg	His	Gly	Val	Pro	Leu	165	170	175	
Ile	Val	Asp	Asn	Thr	Val	Ala	Thr	Pro	Val	Leu	Cys	Arg	Pro	Phe	Glu	180	185	190	
His	Gly	Ala	Asp	Ile	Val	Val	His	Ser	Leu	Thr	Lys	Tyr	Ile	Gly	Gly	195	200	205	
His	Gly	Thr	Ser	Ile	Gly	Gly	Ile	Val	Ile	Asp	Ser	Gly	Lys	Phe	Pro	210	215	220	
Trp	Ala	Glu	Asn	Lys	Glu	Arg	Phe	Ala	Leu	Leu	Asn	Thr	Pro	Asp	Pro	225	230	235	240
Ser	Tyr	His	Gly	Val	Thr	Tyr	Thr	Glu	Ala	Phe	Gly	Pro	Ala	Ala	Phe	245	250	255	
Ile	Gly	Arg	Cys	Arg	Val	Val	Pro	Leu	Arg	Asn	Thr	Gly	Ala	Ala	Leu	260	265	270	
Ser	Pro	Phe	Asn	Ala	Phe	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala				

275					280					285					
Leu	Arg	Met	Glu	Arg	His	Thr	Glu	Asn	Ala	Leu	Lys	Val	Ala	His	Tyr
290						295					300				
Leu	Gln	Ala	His	Glu	Gln	Val	Ala	Trp	Val	Lys	Phe	Ala	Gly	Leu	Pro
305					310					315					320
Asp	His	Pro	Glu	His	Ala	Leu	Ala	Gln	Arg	Tyr	Thr	Gly	Gly	Lys	Pro
				325					330					335	
Ala	Ser	Ile	Leu	Ser	Phe	Gly	Ile	Lys	Gly	Gly	Gln	Ala	Ala	Gly	Ala
			340					345					350		
Arg	Phe	Ile	Asp	Ala	Leu	Gln	Leu	Val	Val	Arg	Leu	Val	Asn	Ile	Gly
			355				360					365			
Asp	Ala	Lys	Ser	Leu	Ala	Cys	His	Pro	Ala	Ser	Thr	Thr	His	Arg	Gln
						375					380				
Leu	Asn	Asp	Asp	Glu	Leu	Glu	Lys	Ala	Gly	Val	Pro	Arg	Asp	Met	Val
385					390					395					400
Arg	Leu	Ser	Ile	Gly	Ile	Glu	His	Ser	Asp	Asp	Ile	Ile	Ala	Asp	Leu
				405					410					415	
Ala	Gln	Ala	Leu	Glu	Ala	Ser	Arg	Gly							
			420					425							

<210> 56

<211> 394

<212> PRT

<213> *Chromobacterium violaceum*

<400> 56

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

Arg	Glu	Ala	Leu	Arg	Pro	Asn	Thr	Lys	Leu	Leu	Phe	Leu	Glu	Thr	Pro	145	150	155	160
Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Glu	Val	Ala	Asp	Ile	Ala	Ala	Ile	Ala	Asp	Ile	165	170	175	
Ala	His	Ala	His	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Ser	Phe	Cys	Ser	180	185	190	
Pro	Ala	Leu	Gln	Gln	Pro	Leu	Lys	Leu	Gly	Ala	Asp	Leu	Val	Met	His	195	200	205	
Ser	Ala	Thr	Lys	Phe	Ile	Asp	Gly	His	Gly	Arg	Val	Met	Gly	Gly	Ala	210	215	220	
Val	Val	Gly	Ser	Asp	Lys	Leu	Val	Glu	Gln	Val	Tyr	Leu	His	Val	Arg	225	230	235	240
Ala	Ala	Gly	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Phe	Asn	Ala	Trp	Thr	Leu	Leu	Ser	245	250	255	
Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	His	Leu	Arg	Met	Glu	Lys	His	Ser	Ala	Asn	Ala	260	265	270	
Leu	Glu	Leu	Ala	Arg	Trp	Leu	Glu	Ala	Gln	Pro	Asn	Val	Glu	Arg	Val	275	280	285	
Tyr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Glu	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Ala	Leu	Arg	290	295	300	
Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Gly	Ala	Val	Val	Ser	Phe	Val	Val	Lys	Gly	Gly	305	310	315	320
Arg	Lys	Ala	Ala	Trp	Lys	Val	Val	Asp	Ala	Val	Arg	Val	Ile	Ser	Arg	325	330	335	
Thr	Ala	Asn	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Ala	Ser	340	345	350	
Thr	Thr	His	Ala	Arg	Val	Thr	Gln	Glu	Ala	Arg	Glu	Arg	Ala	Gly	Ile	355	360	365	
Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Arg	Val	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Asn	Val	Arg	Asp	370	375	380	
Leu	Gln	Gln	Asp	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Asp							385	390		

<210> 57

<211> 404

<212> PRT

<213> *Nocardia farcinica*

<400> 57

ES 2 595 453 T3

Val	Ile	Thr	Gly	Gly	Ala	Phe	Asp	Lys	Pro	Leu	Pro	Glu	Gly	Val	Gly
1				5					10					15	
Pro	Ala	Thr	Leu	Gly	Val	Arg	Gly	Gly	Leu	Arg	Arg	Ser	Gly	Phe	Glu
			20					25					30		
Glu	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Thr	Ser	Gly	Phe	Val	Tyr	Glu	Ser
		35					40					45			

Ala Glu Ala Ala Glu Ala Ala Phe Thr Gly Glu Val Glu His Phe Val
 50 55 60
 Tyr Ser Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Val Ala Met Phe Glu Glu Arg Ile
 65 70 75 80
 Arg Leu Met Asp Gly Ala Glu Ala Ala Phe Ala Thr Ala Ser Gly Met
 85 90 95
 Ser Ala Val Phe Thr Ala Leu Gly Ala Leu Leu Gly Ala Gly Asp Arg
 100 105 110
 Leu Val Ala Ala Arg Ser Leu Phe Gly Ser Cys Phe Val Val Cys Asn
 115 120 125
 Glu Ile Leu Pro Arg Trp Gly Val Glu Thr Val Phe Val Asp Gly Glu
 130 135 140
 Asp Leu Asp Gln Trp Glu Arg Ala Leu Ser Val Pro Thr Ala Ala Val
 145 150 155 160
 Phe Phe Glu Thr Pro Ala Asn Pro Met Gln Thr Leu Val Asp Val Arg
 165 170 175
 Arg Val Thr Glu Leu Ala His Ala Ala Gly Ala Lys Val Val Leu Asp
 180 185 190
 Asn Val Phe Ala Thr Pro Leu Leu Gln Lys Gly Phe Asp Leu Gly Ala
 195 200 205
 Asp Val Val Val Tyr Ser Gly Thr Lys His Ile Asp Gly Gln Gly Arg
 210 215 220
 Val Leu Gly Gly Ala Ile Leu Gly Asp Arg Glu Tyr Ile Asp Gly Pro
 225 230 235 240
 Val Lys Thr Leu Met Arg His Thr Gly Pro Ala Leu Ser Pro Phe Asn
 245 250 255
 Ala Trp Thr Leu Leu Lys Gly Leu Glu Thr Met Pro Leu Arg Val Arg
 260 265 270
 His Ser Thr Glu Ser Ala Leu Arg Ile Ala Arg Phe Leu Glu Ser Asn
 275 280 285
 Pro Ala Val Ser Trp Val Lys Tyr Pro Phe Leu Glu Ser His Pro Gln
 290 295 300
 Tyr Asp Leu Ala Arg Ala Gln Met Ser Gly Gly Gly Thr Val Val Thr
 305 310 315 320
 Phe Glu Leu Lys Ala Ala Glu Gly Glu Ala Lys Lys Arg Ala Phe Glu
 325 330 335
 Val Leu Asp Arg Leu Arg Ile Ile Asp Ile Ser Asn Asn Leu Gly Asp
 340 345 350
 Ala Lys Thr Leu Ile Thr His Pro Ala Thr Thr Thr His Arg Ala Met
 355 360 365
 Gly Pro Glu Gly Arg Ala Gly Ile Gly Leu Thr Asp Gly Val Val Arg
 370 375 380

Ile Ser Val Gly Leu Glu Asp Val Asp Asp Leu Leu Ser Asp Leu Glu
 385 390 395 400

His Ala Leu Ser

5 <210> 58
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> *Bradyrhizobium Japonicum*

10 <400> 58

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

260	265	270
Trp Val Leu Leu Lys Gly Leu Glu Thr Leu Ala Val Arg Val Arg Ala		
275	280	285
Gln Thr Asp Thr Ala Ala Ser Val Ala Glu Val Leu Ala Gly His Pro		
290	295	300
Lys Ile Ser Arg Leu Ile Tyr Pro Gly Arg Ala Asp His Pro Gln Ala		
305	310	315
Ala Leu Val Lys Lys Gln Met Arg Gly Gly Ser Thr Leu Val Gly Phe		
325	330	335
Glu Val Lys Gly Gly Lys Ala Ala Ala Phe Arg Val Leu Asn Glu Leu		
340	345	350
Lys Leu Ala Lys Ile Ser Asn Asn Leu Gly Asp Ala Lys Ser Leu Val		
355	360	365
Thr His Pro Ala Thr Thr Thr His Gln Arg Leu Lys Pro Glu Asp Arg		
370	375	380
Ala Ala Leu Gly Ile Ser Glu Gly Phe Ile Arg Phe Ser Ala Gly Leu		
385	390	395
Glu His Ala Asp Asp Leu Ile Glu Asp Leu Thr Ala Ala Leu Glu Lys		
405	410	415
Ala		

<210> 59
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> *Hyphomonas Neptunium*
 <400> 59

Met Ala Asp Ala Pro Gly Gly Asp Lys Lys Gly Trp Lys Pro Ala Thr
1 5 10 15
Gln Ala Val Arg Gly Gly Leu Met Arg Ser Gln His Gly Glu Ile Ser
20 25 30
Glu Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Gly Tyr Ala Tyr Asp Ser Ala Glu Gln
35 40 45
Ala Met Arg Arg Met Ala Gly Glu Glu Glu Gly Phe Val Tyr Ser Arg
50 55 60
Tyr Gly Ser Pro Thr Asn Glu Met Leu Gln Gln Arg Leu Ala Leu Ile
65 70 75 80
Glu Gly Ala Glu Ala Cys Arg Val Thr Gly Ser Gly Met Gly Ala Ile
85 90 95
Ser Ser Ala Ile Leu Ala Pro Leu Lys Ala Gly Asp Arg Val Val Ala
100 105 110
Ala Thr Ala Leu Phe Gly Ser Cys Arg Trp Ile Ile Ala Asn Gln Met
115 120 125

Pro Lys Phe Gly Ile Glu Ala Val Phe Val Asp Gly Ala Asp Leu Asp
130 135 140

Ala Trp Lys Arg Glu Ile Asp Lys Gly Cys Gln Leu Val Leu Ile Glu
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asn Pro Leu Leu Asp Gly Val Asp Ile Glu Ala Val Ala
165 170 175

Arg Leu Ala Lys Ala Ala Gly Ala Leu Leu Val Val Asp Asn Val Phe
180 185 190

Ala Thr Pro Val Leu Gln Arg Pro Leu Glu Met Gly Ala Asp Val Ile
195 200 205

Ala Tyr Ser Ala Thr Lys His Met Asp Gly Gln Gly Arg Val Leu Leu
210 215 220

Gly Ala Ile Leu Thr Asp Ala Lys Arg Met Ser Asp Val Tyr Asp Pro
225 230 235 240

Trp Leu Arg His Met Gly Pro Ala Ala Ser Pro Phe Asn Ala Trp Val
245 250 255

Val Leu Lys Gly Leu Glu Thr Met Gln Leu Arg Val Glu Ala Gln Ser
260 265 270

Arg Thr Ala Ala Arg Leu Ala Asp Val Leu Ala Asp His Pro Ala Val
275 280 285

Asn Ala Val Arg Tyr Pro His Arg Lys Asp His Pro His Tyr Glu Val
290 295 300

His Lys Arg Gln Met Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Ala Leu Ser Leu
305 310 315 320

Lys Gly Gly Gln Asp Ala Ala Phe Arg Phe Leu Asn Gly Leu Gln Leu
325 330 335

Val Asp Ile Cys Asn Asn Leu Gly Asp Thr Lys Ser Leu Ala Cys His
340 345 350

Pro Ser Thr Thr Thr His Arg Ala Leu Ser Asp Glu Asp Gln Ala Ala
355 360 365

Met Gly Leu Asp Arg Ser Trp Val Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp
370 375 380

Ala Asp Asp Leu Glu Ala Asp Leu Leu Ala Ser Leu Asn Ser Leu
385 390 395

<210> 60
<211> 383
<212> PRT
<213> *Methylococcus Capsulatus*

<400> 60

Met	Glu	Thr	Arg	Ala	Val	Arg	Ala	Gly	Gln	Arg	Arg	Thr	Met	Glu	Gln
1				5					10					15	
Glu	His	Ala	Glu	Pro	Ile	Phe	Ala	Thr	Ser	Ser	Tyr	Val	Phe	Ala	Ser
			20					25					30		

Ala Ala Glu Ala Ala Glu Arg Phe Ala Gly Lys Ala Ala Gly Asn Ile
35 40 45

Tyr Ser Arg Phe Thr Asn Pro Thr Val Arg Thr Phe Glu Glu Arg Leu
50 55 60

Ala Ala Leu Glu Gly Gly Glu Arg Cys Val Ala Val Gly Ser Gly Met
65 70 75 80

Ala Ala Ile Ala Ser Thr Ala Phe Gly Leu Leu Lys Ala Gly Asp His
85 90 95

Val Val Cys Ser Arg Ser Val Phe Gly Asn Thr Thr Leu Leu Phe Gln
100 105 110

Asn Tyr Leu Ala Lys Phe Gly Val Pro Thr Thr Phe Val Gly Leu Thr
115 120 125

Asp Tyr Asp Gly Trp Ala Ala Ala Ile Arg Pro Glu Thr Arg Phe Leu
130 135 140

Phe Ile Glu Thr Pro Ser Asn Pro Leu Thr Glu Ile Ala Asp Ile Pro
145 150 155 160

Arg Leu Ala Glu Ile Ala His Ser Arg Gly Cys Leu Leu Val Val Asp
165 170 175

Asn Cys Phe Cys Thr Pro Ala Leu Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala
180 185 190

Asp Ile Val Ile His Ser Ala Thr Lys Tyr Leu Asp Gly Gln Gly Arg
195 200 205

Cys Val Gly Gly Ala Ile Val Gly Gly Arg Glu Leu Leu Asp Ala Glu
210 215 220

Ile Tyr Pro Phe Leu Arg Thr Gly Gly Pro Ser Met Ser Pro Phe Asn
225 230 235 240

Ala Trp Val Phe Leu Lys Gly Leu Glu Thr Leu Asn Leu Arg Met Lys
245 250 255

Ala His Cys Glu Asn Ala Leu Gly Leu Ala Arg Trp Leu Glu Ala Gln
260 265 270

Pro Trp Val Glu Arg Val His Tyr Pro Gly Leu Ala Ser His Pro Gln
275 280 285

His Glu Leu Ala Ala Arg Gln Gln Ser Gly Phe Gly Gly Ile Val Ser
290 295 300

Phe Glu Val Lys Gly Gly Gln Glu Ala Ala Trp Arg Leu Ile Asp Ser
305 310 315 320

Thr Arg Leu Leu Ser Ile Thr Gly Asn Leu Gly Asp Ala Lys Thr Thr
325 330 335

Ile Thr His Pro Ala Thr Thr Thr His Gly Arg Leu Ser Pro Glu Ala
340 345 350

Arg Ala Ala Ala Gly Ile Ala Asp Gly Leu Ile Arg Ile Ala Val Gly
355 360 365

Leu Glu Asn Leu Ala Asp Ile Gln Ala Asp Leu Ala Arg Phe Ala
370 375 380

<210> 61
<211> 392
<212> PRT
<213> *Methylobacillus Flagellatus*
<400> 61

Met Ser Gln His Glu Trp His Ala Glu Thr Leu Gly Val Arg Ala Gly
1 5 10 15
Ser Glu His Thr Pro Phe Gly Glu Asn Ser Glu Ala Met Phe Leu Thr
20 25 30
Ser Ser Phe Val Phe Glu Asn Ala Ala Gln Ala Ala Arg Phe Gly
35 40 45
Gly Gln Glu Pro Gly Asn Ile Tyr Ser Arg Phe Thr Asn Pro Thr Val
50 55 60
Ser Met Phe Gln Asn Lys Leu Ala Ala Leu Glu Gly Ala Glu Phe Cys
65 70 75 80
Val Ala Thr Ser Ser Gly Met Ser Ala Ile Leu Ala Cys Val Met Gly
85 90 95
Val Cys Ser Ala Gly Asp His Val Val Ala Ser Arg Ser Ile Phe Gly
100 105 110
Thr Ser Val Gln Leu Phe Ser Asn Ile Leu Lys Arg Trp Gly Leu Glu
115 120 125
Thr Thr Phe Val Gln Leu Ser Asp Pro Glu Ala Trp Thr Ala Ala Val
130 135 140
Lys Pro Asn Thr Lys Leu Phe Phe Leu Glu Thr Pro Ser Asn Pro Leu
145 150 155 160
Thr Glu Ile Cys Asp Ile Ala Val Val Ala Glu Ile Ala His Gln Ala
165 170 175
Gly Ala Leu Leu Ala Val Asp Asn Cys Phe Cys Thr Pro Ala Leu Gln
180 185 190
Lys Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Ile Val Val His Ser Ala Thr Lys
195 200 205
Tyr Ile Asp Gly Gln Gly Arg Cys Leu Gly Gly Ala Val Leu Gly Arg
210 215 220
Lys Asp Val Leu Glu Pro Val Tyr Gly Phe Leu Arg Thr Ala Gly Pro
225 230 235 240
Thr Met Ser Ala Phe Asn Ala Trp Val Phe Leu Lys Gly Leu Glu Thr
245 250 255
Leu His Leu Arg Met Glu Ala His Ala Arg Asn Ala Leu Ala Leu Ala
260 265 270

Gln	Trp	Leu	Glu	Gln	Gln	Pro	Arg	Val	Glu	Arg	Val	Tyr	Tyr	Pro	Gly
		275					280					285			
Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	Tyr	Ala	Leu	Ala	Gln	Lys	Gln	Gln	Lys	Ser
	290					295					300				
Gly	Gly	Ala	Ile	Val	Ser	Phe	Asp	Val	Lys	Gly	Gly	Gln	Pro	Ala	Ala
305					310					315					320
Trp	His	Leu	Ile	Asp	Ala	Thr	Arg	Met	Leu	Ser	Ile	Thr	Ala	Asn	Leu
				325					330					335	
Gly	Asp	Ala	Lys	Ser	Thr	Ile	Thr	His	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	His	Ser
			340					345						350	
Arg	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Gly	Asp	Gly	Leu
		355					360					365			
Val	Arg	Ile	Ala	Val	Gly	Leu	Glu	His	Ile	Asp	Asp	Ile	Lys	Ala	Asp
	370					375					380				
Leu	Ala	Trp	Leu	Gly	His	Gln	Asp								
385					390										

<210> 62
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> *Nitrosomonas Europaea*
 <400> 62

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

165										170					175				
Val	Trp	Leu	Ala	Val	Asp	Asn	Cys	Phe	Cys	Thr	Pro	Ile	Ile	Gln	Gln				
			180					185					190						
Pro	Leu	Lys	Leu	Gly	Ala	Asp	Leu	Val	Ile	His	Ser	Ala	Thr	Lys	Tyr				
		195					200					205							
Leu	Asp	Gly	Gln	Gly	Arg	Val	Leu	Gly	Gly	Ala	Ile	Leu	Gly	Lys	Arg				
	210					215					220								
Asp	Leu	Leu	Met	Asp	Ser	Gly	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Arg	Thr	Ala	Gly				
225					230				235						240				
Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Phe	Asn	Ala	Trp	Ile	Ile	Leu	Lys	Gly	Met	Glu				
				245				250						255					
Thr	Leu	Ser	Leu	Arg	Val	Lys	Ala	His	Ser	Asp	His	Ala	Leu	Glu	Val				
			260					265					270						
Ala	Arg	Trp	Leu	Glu	Thr	His	Pro	Arg	Val	Gly	Arg	Val	Phe	Tyr	Pro				
		275					280					285							
Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Ala	Met	Arg	Gln	Gln	Lys				
	290					295					300								
Thr	Gly	Gly	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Glu	Val	Lys	Gly	Gly	Arg	Glu	Ala				
305					310					315					320				
Ala	Trp	Arg	Val	Val	Asp	Ala	Ala	Arg	Leu	Met	Ser	Ile	Thr	Ala	Asn				
			325					330						335					
Leu	Gly	Asp	Thr	Lys	Ser	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	His				
			340					345					350						
Gly	Arg	Ile	Ser	Gln	Glu	Ala	Arg	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Arg	Asp	Gly				
		355					360					365							
Leu	Leu	Arg	Ile	Ala	Val	Gly	Leu	Glu	Ser	Pro	Asp	Asp	Leu	Lys	Ala				
	370					375					380								
Asp	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Gln													
385					390														

<210> 63
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> *Klesiella pneumoniae*
 <400> 63

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

Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile
 65 70 75 80
 Leu Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala
 85 90 95
 Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala
 100 105 110
 Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Gln Phe Val Asp Gln Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu
 130 135 140
 Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys
 145 150 155 160
 Gly Leu Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ile Ser Val Val Asp Asn Thr Phe
 165 170 175
 Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val
 180 185 190
 Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala
 195 200 205
 Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Thr Thr Val Thr Glu Leu Ala Trp
 210 215 220
 Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Ser Ala Phe Asp Ser Tyr Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Ser Pro Arg Met Glu Val Ala Gln
 245 250 255
 Arg Asn Ala Leu Ala Ile Val Glu Tyr Leu Lys Thr Gln Pro Leu Val
 260 265 270
 Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile
 275 280 285
 Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu
 290 295 300
 Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Ser Gly Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His
 325 330 335
 Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala
 340 345 350
 Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp
 355 360 365
 Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn
 370 375 380
 Glu Glu
 385

5 <210> 64
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> *Bacillus subtilis*

 <400> 64

Met	Ser	Gln	His	Val	Glu	Thr	Lys	Leu	Ala	Gln	Ile	Gly	Asn	Arg	Ser	1	5	10	15
Asp	Glu	Val	Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Ala	Pro	Ile	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ala	20	25	30	
Tyr	Arg	His	Arg	Gly	Ile	Gly	Glu	Ser	Thr	Gly	Phe	Asp	Tyr	Val	Arg	35	40	45	
Thr	Lys	Asn	Pro	Thr	Arg	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Ala	Ile	Ala	Asn	Leu	50	55	60	
Glu	Asn	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Ala	Phe	Ser	Ser	Gly	Met	Ala	Ala	Ile	65	70	75	80
Gln	Thr	Ile	Met	Ala	Leu	Phe	Lys	Ser	Gly	Asp	Glu	Leu	Ile	Val	Ser	85	90	95	
Ser	Asp	Leu	Tyr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Arg	Leu	Phe	Glu	Asn	Glu	Trp	Lys	100	105	110	
Lys	Tyr	Gly	Leu	Thr	Phe	His	Tyr	Asp	Asp	Phe	Ser	Asp	Glu	Asp	Cys	115	120	125	
Leu	Arg	Ser	Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Thr	Lys	Ala	Val	Phe	Val	Glu	Thr	130	135	140	
Pro	Thr	Asn	Pro	Leu	Met	Gln	Glu	Ala	Asp	Ile	Glu	His	Ile	Ala	Arg	145	150	155	160
Ile	Thr	Lys	Glu	His	Gly	Leu	Leu	Leu	Ile	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Tyr	165	170	175	
Thr	Pro	Val	Leu	Gln	Arg	Pro	Leu	Glu	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Val	Ile	180	185	190	
His	Ser	Ala	Thr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Gly	His	Asn	Asp	Leu	Leu	Ala	Gly	195	200	205	
Leu	Val	Val	Val	Lys	Asp	Glu	Arg	Leu	Gly	Glu	Glu	Met	Phe	Gln	His	210	215	220	
Gln	Asn	Ala	Ile	Gly	Ala	Val	Leu	Pro	Pro	Phe	Asp	Ser	Trp	Leu	Leu	225	230	235	240
Met	Arg	Gly	Met	Lys	Thr	Leu	Ser	Leu	Arg	Met	Arg	Gln	His	Gln	Ala	245	250	255	
Asn	Ala	Gln	Glu	Leu	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Gln	Glu	Glu	Ile	Ser	260	265	270	
Asp	Val	Leu	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Met	Leu	Ser	Phe	Arg	Leu	Gln	275	280	285	
Lys	Glu	Glu	Trp	Val	Asn	Pro	Phe	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	Ile	Cys	290	295	300	

Phe Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Phe Ile Thr Tyr Pro Ala
 305 310 315 320
 Thr Gln Thr His Met Asp Ile Pro Glu Glu Ile Arg Ile Ala Asn Gly
 325 330 335
 Val Cys Asn Arg Leu Leu Arg Phe Ser Val Gly Ile Glu His Ala Glu
 340 345 350
 Asp Leu Lys Glu Asp Leu Lys Gln Ala Leu Cys Gln Val Lys Glu Gly
 355 360 365
 Ala Val Ser Phe Glu
 370

<210> 65
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> *Shigella flexneri* 2457T

<400> 65

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

210	215	220
Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu 225 230 235 240		
Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln 245 250 255		
Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val 260 265 270		
Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile 275 280 285		
Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu 290 295 300		
Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Cys Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu 305 310 315 320		
Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His 325 330 335		
Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala 340 345 350		
Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp 355 360 365		
Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn 370 375 380		
Lys Gly 385		

<210> 66
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> *Colwellia Psychrerythraea*
 <400> 66

ES 2 595 453 T3

Met	Ser	Ile	Thr	Lys	Lys	Gly	Asn	Ile	Thr	Thr	Ser	Ala	Val	Arg	Ala	1	5	10	15
Gly	Ile	Asn	Thr	Asp	Gln	Gln	His	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Pro	Ile	Tyr	20	25	30	
Leu	Ser	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Lys	Gly	Phe	Asn	Asn	Lys	Arg	Gln	Phe	35	40	45	
Asp	Tyr	Ser	Arg	Thr	Gly	Asn	Pro	Thr	Arg	Ala	Thr	Phe	Ala	Gly	Ala	50	55	60	
Ile	Ala	Glu	Leu	Glu	Gln	Gly	Ser	Val	Gly	Ile	Val	Thr	Ser	Thr	Gly	65	70	75	80
Met	Ala	Ala	Val	His	Leu	Ile	Cys	Gln	Leu	Leu	Ser	Thr	Gln	Asp	Thr	85	90	95	
Val	Val	Ile	Pro	His	Asp	Cys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Leu	Phe	Thr	100	105	110	

His	Leu	Ala	Lys	Arg	Gly	Gln	Phe	Lys	Leu	Ile	Val	Val	Asp	Gln	Asn		
115						120					125						
Asp	Gln	Gln	Ala	Leu	Asp	Asn	Ala	Leu	Ala	His	Lys	Pro	Lys	Leu	Val		
130						135					140						
Leu	Leu	Glu	Ser	Pro	Ser	Asn	Pro	Leu	Leu	Arg	Leu	Val	Asp	Ile	Glu		
145						150					155					160	
Val	Val	Thr	Lys	Ala	Cys	His	Ala	Val	Gly	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Asp		
165						170					175						
Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Pro	Ala	Leu	Gln	Gln	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Ala		
180						185					190						
Asp	Ile	Val	Phe	His	Ser	Thr	Thr	Lys	Tyr	Ile	Asn	Gly	His	Ser	Asp		
195						200					205						
Val	Val	Gly	Gly	Val	Val	Val	Ala	Lys	Thr	Glu	Glu	Leu	Gly	Glu	Gln		
210						215					220						
Leu	Ala	Trp	Trp	Ala	Asn	Cys	Ile	Gly	Ile	Thr	Gly	Ser	Ala	Phe	Asp		
225						230					235					240	
Ser	Phe	Leu	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	Pro	Val	Arg	Met	Lys		
245						250					255						
Gln	His	Gln	Glu	Asn	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Asp	Phe	Leu	Lys	Asn	His		
260						265					270						
Asp	Ala	Ile	Asp	Ala	Ile	Tyr	Phe	Pro	Gly	Phe	Pro	Glu	His	Thr	Gly		
275						280					285						
His	His	Ile	Ala	Lys	Lys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ala	Met	Leu	Ser		
290						295					300						
Phe	Glu	Ile	Lys	Gly	Asp	Val	Glu	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Phe	Glu	Asn		
305						310					315					320	
Leu	Glu	Leu	Phe	Thr	Leu	Ala	Gln	Ser	Leu	Gly	Gly	Val	Glu	Ser	Leu		
325						330					335						
Ile	Ser	His	Pro	Ser	Thr	Met	Thr	His	Ala	Gly	Met	Thr	Ile	Pro	Asp		
340						345					350						
Gln	Leu	Glu	Ala	Gly	Ile	Thr	Gln	Ser	Leu	Val	Arg	Ile	Ser	Val	Gly		
355						360					365						
Ile	Glu	Asp	Ile	Asp	Asp	Ile	Leu	Ala	Asp	Leu	Ala	His	Gly	Leu	Thr		
370						375					380						
Gln	Ser	Gln	Leu														
385																	

<210> 67
<211> 386
<212> PRT
<213> *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A

<400> 67

ES 2 595 453 T3

Met	Thr	Arg	Lys	Gln	Ala	Thr	Ile	Ala	Val	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Asp
1				5					10					15	

Asp Glu Gln Tyr Gly Cys Val Val Pro Pro Ile His Leu Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Asn Phe Thr Gly Phe Asn Glu Pro Arg Ala His Asp Tyr Ser Arg
 35 40 45
 Arg Gly Asn Pro Thr Arg Asp Val Val Gln Arg Ala Leu Ala Glu Leu
 50 55 60
 Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile
 65 70 75 80
 His Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala
 85 90 95
 Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala
 100 105 110
 Thr Arg Gly Cys Tyr Cys Val Arg Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Arg
 115 120 125
 Ala Leu Gln Ala Ala Leu Glu Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu
 130 135 140
 Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys
 145 150 155 160
 Arg Leu Ala Arg Glu Ala Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe
 165 170 175
 Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val
 180 185 190
 Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala
 195 200 205
 Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Ala Trp
 210 215 220
 Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln
 245 250 255
 Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val
 260 265 270
 Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile
 275 280 285
 Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu
 290 295 300
 Asp Gly Asp Glu Glu Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His
 325 330 335
 Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ser Pro Gln Ala Arg Ala Ala
 340 345 350

Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp
 355 360 365
 Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Gly Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn
 370 375 380
 Lys Gly
 385

5 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

10 <400> 68
 catatgccca ccctcgcgcc 20

15 <210> 69
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

20 <400> 69
 aagcttttag atgtagaact cgatg25

25 <210> 70
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400> 70

caatttcttg cgtgaagaaa acgtctttgt gatgacaact tctcgtgcgt gtgtaggetg 60
 gagctgcttc 70

30 <210> 71
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400> 71

aatccagcgt tggattcatg tgccgtagat cgtatggcgt gatctggtag catatgaata 60
 tcttccttag 70

35 <110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

40 <120> Microorganismo productor de precursor de L-metionina y método para producir L-metionina y ácido orgánico usando el precursor de L-metionina

<130> 69.67.98072/01

45 <150> EP 07793305.9
 <151> 30-07-2007

<150> PCT/KR2007/003650
 <151> 30-07-2007

50 <150> KR 10-2006-0071581
 <151> 28-07-2006

	<150> KR 10-2007-0076045	
	<151> 27-07-2007	
5	<160> 71	
	<170> KopatentIn 1.71	
10	<210> 1	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador para la amplificación de cloranfenicol	
	<400> 1	
	ttactctggt gcctgacatt tcaccgacaa agcccaggga acttcacac gtgtaggctg	60
	gagctgcttc	70
20	<210> 2	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador para la amplificación de cloranfenicol	
	<400> 2	
	ttaccoccttg ttgagccc ggaagccatt ttccaggctg gcaattaaat catatgaata	60
30	tcctccttag	70
35	<210> 3	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador para la amplificación de kanamicina	
40	<400> 3	
	aaagaatatg ccgatcgggt cgggcttagg ctccagtgc tttcgggtgg gtgtaggctg	60
	gagctgcttc	70
45	<210> 4	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador para la amplificación de kanamicina	
	<400> 4	
	agacaaccga catcgcttcc aacattggcg accggagccg ggaaggcaaa catatgaata	60
55	tcctccttag	70

5	<210> 5 <211> 71 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador para la amplificación de cloranfenicol <400> 5	
	atggctgaat ggagcggcga atatatcagc ccatacgtg agcacggcaa ggtgtaggct	60
	ggagctgctt c	71
15	<210> 6 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador para la amplificación de cloranfenicol <400> 6	
	gtattccac gtctccgggt taatcccat ctcacgatg atctccatat gaatatcctc	60
	cttag	65
25	<210> 7 <211> 19 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
30	<400> 7 gggctttgtc ggtgaaatg 19	
35	<210> 8 <211> 19 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
40	<400> 8 actttgcgat gagcgagag 19	
45	<210> 9 <211> 28 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
	<400> 9 aatggatcct gccgtgagcg gcgaatac 28	
50	<210> 10 <211> 28 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
55	<400> 10 agctctagac tgctgagga cgtttcgg 28	
60	<210> 11 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Leptospira meyeri</i>	

	<400> 11 catatgccta cctccgaaca gaa	23
5	<210> 12 <211> 26 <212> ADN <213> <i>Leptospira meyeri</i>	
10	<400> 12 aagctttcaa aggaaaactc cttcgt	26
15	<210> 13 <211> 33 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
20	<400> 13 gagatatacc atggtgacgc gtaaacaggc cac	33
25	<210> 14 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
30	<400> 14 ccgcaagctt ttaccctt gttgcagcc	30
35	<210> 15 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
40	<400> 15 ggaattccat atgactcagg actgggatgc	30
45	<210> 16 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
50	<400> 16 ccttaattaa tcacagcgcg gccagcc	27
55	<210> 17 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Pseudomonas putida</i>	
60	<400> 17 ggaattccat atgacggatc aatgggatgc	30
65	<210> 18 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Pseudomonas putida</i>	
	<400> 18 ccttaattaa tcacaatgcc gccagcc	27
	<210> 19 <211> 29 <212> ADN <213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<400> 19 ggaattccat atgaagctgg aaacgcttg	29

5 <210> 20
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 20
 ccttaattaa tcagccgagg ctggcctc 28
 10 <210> 21
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 15 <400> 21
 cgcaggccat ggtgtcttt gacccaaac 29
 <210> 22
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 22
 ccgccgaagc ttctaaaggt tattgag 27
 25 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 30 <400> 23
 agtcgtcata tgccaaagta cgacaattcc 30
 <210> 24
 <211> 31
 35 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 24
 40 ctggcaccta ggctagattg cagcaaagcc g 31
 <210> 25
 <211> 28
 <212> ADN
 45 <213> *Leptospira meyeri*
 <400> 25
 agtcgtcata tggtaggacc atcggggg 28
 50 <210> 26
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Leptospira meyeri*
 55 <400> 26
 ctggcaccta ggtatcaga ttttttaa tgcctctt 38
 <210> 27
 <211> 28
 60 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 27
 65 ggaattccat atgcatctc atttcgat 28
 <210> 28

<211> 28
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 5 <400> 28
 ccttaattaa tcatggtttt tggccagc 28
 <210> 29
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> *Chromobacterium violaceum*
 <400> 29
 catatggcat ccgacgcgcc g 21
 15 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Chromobacterium violaceum*
 20 <400> 30
 cctaggttag tcaaggcccc gcaa 24
 <210> 31
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> *Nocardia farcinica*
 <400> 31
 30 catatggtga tcaccggcgg cgcg 24
 <210> 32
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> *Nocardia farcinica*
 <400> 32
 cctaggtcag ctcagcgcgt gctc 24
 40 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Bradyrhizobium Japonicum*
 45 <400> 33
 catatggtgg atatatccag gccg 24
 <210> 34
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> *Bradyrhizobium Japonicum*
 <400> 34
 55 cctaggtcac gccttctcca gcgc 24
 <210> 35
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Hyphomonas Neptunium*
 60 <400> 35
 ggatccgatg gcggatgcac ccggc 25
 <210> 36
 <211> 24
 65 <212> ADN

<213> *Hyphomonas Neptunium*
 <400> 36
 aagctttcac aagctgttaa gcga 24
 5
 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Methylococcus Capsulatus*
 10
 <400> 37
 catatggaga cccgggccgt g 21
 15
 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Methylococcus Capsulatus*
 20
 <400> 38
 cctaggtcag gcgaagcgag cca 23
 25
 <210> 39
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Methylobacillus Flagellatus*
 <400> 39
 catatgagtc agcatgaatg gcatg 25
 30
 <210> 40
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Methylobacillus Flagellatus*
 35
 <400> 40
 cctaggagtc agcatgaatg gcatg 25
 40
 <210> 41
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Nitrosomonas Europaea*
 <400> 41
 catatgacga acgatctgga tc 22
 45
 <210> 42
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Nitrosomonas Europaea*
 50
 <400> 42
 cctaggttat tgcaatccgc gagca 25
 55
 <210> 43
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Klesiella pneumoniae*
 60
 <400> 43
 catatgacgc gtaaacaggc cac 23
 65
 <210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Klesiella pneumoniae*

	<400> 44 cctaggttat tcctcgttg ctgcc	25
5	<210> 45 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Bacillus subtilis</i>	
10	<400> 45 catatgtcac agcacgttga aac	23
15	<210> 46 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Bacillus subtilis</i>	
20	<400> 46 cctaggttac tcaaatgaaa cagctcc	27
25	<210> 47 <211> 24 <212> ADN <213> <i>Shigella flexneri</i> 2457T	
30	<400> 47 catatgacgc gtaaacaggc cacc	24
35	<210> 48 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Shigella flexneri</i> 2457T	
40	<400> 48 cctaggttac ccctgtttg cagcccg	27
45	<210> 49 <211> 33 <212> ADN <213> <i>Colwellia Psychrerythraea</i>	
50	<400> 49 catatgtcga ttactaaaaa aggtaatat acc	33
55	<210> 50 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Colwellia Psychrerythraea</i>	
60	<400> 50 cctaggttac agttggctct gcgtaaacc	30
65	<210> 51 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi A	
	<400> 51 catatgacgc gtaaacaggc cac23	
	<210> 52 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi A	
	<400> 52 cctaggttac ccctgtttg cagcccg	27

<210> 53

<211> 403

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 53

```

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

```

```

Ile Ala Ala Leu Ala Glu Ile Ala His Ala Lys Gly Ala Leu Leu Ala
      180                      185                      190

Val Asp Asn Cys Phe Cys Thr Pro Ala Leu Gln Gln Pro Leu Lys Leu
      195                      200                      205

Gly Ala Asp Val Val Ile His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Asp Gly Gln
      210                      215                      220

Gly Arg Gly Met Gly Gly Val Val Ala Gly Arg Gly Glu Gln Met Lys
      225                      230                      235                      240

Glu Val Val Gly Phe Leu Arg Thr Ala Gly Pro Thr Leu Ser Pro Phe
      245                      250                      255

Asn Ala Trp Leu Phe Leu Lys Gly Leu Glu Thr Leu Arg Ile Arg Met
      260                      265                      270

Gln Ala His Ser Ala Ser Ala Leu Ala Leu Ala Glu Trp Leu Glu Arg
      275                      280                      285

Gln Pro Gly Ile Glu Arg Val Tyr Tyr Ala Gly Leu Gln Ser His Pro
      290                      295                      300

Gln His Glu Leu Ala Arg Arg Gln Gln Ser Gly Phe Gly Ala Val Val
      305                      310                      315                      320

Ser Phe Asp Val Lys Gly Gly Arg Asp Ala Ala Trp Arg Phe Ile Asp
      325                      330                      335

Ala Thr Arg Met Val Ser Ile Thr Thr Asn Leu Gly Asp Thr Lys Thr
      340                      345                      350

Thr Ile Ala His Pro Ala Thr Thr Ser His Gly Arg Leu Ser Pro Glu
      355                      360                      365

Asp Arg Ala Arg Ala Gly Ile Gly Asp Ser Leu Ile Arg Val Ala Val
      370                      375                      380

Gly Leu Glu Asp Leu Asp Asp Leu Lys Ala Asp Met Ala Arg Gly Leu
      385                      390                      395                      400

Ala Ala Leu

```

<210> 54
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas putida*
 <400> 54

ES 2 595 453 T3

Met	Thr	Asp	Gln	Trp	Asp	Ala	Gly	Arg	Leu	Asp	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly
1				5				10					15		
Val	Gly	Phe	Asp	Thr	Leu	Ala	Val	Arg	Ala	Gly	Gln	His	Arg	Thr	Pro
			20					25					30		
Glu	Gly	Glu	His	Ser	Glu	Ala	Leu	Phe	Leu	Thr	Ser	Ser	Tyr	Val	Phe
		35					40					45			
Arg	Thr	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Ala	Gly	Glu	Thr	Pro	Gly
	50					55					60				

Asn	Val	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Thr	Asn	Pro	Ser	Val	Arg	Ala	Phe	Glu	Glu	65	70	75	80
Arg	Leu	Ala	Ala	Met	Glu	Gly	Ala	Glu	Gln	Ala	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	85	90	95	
Gly	Met	Ala	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Val	Met	Ser	Leu	Cys	Ser	Ala	Gly	100	105	110	
Asp	His	Val	Leu	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Phe	Gly	Ser	Thr	Ile	Ser	Leu	115	120	125	
Phe	Glu	Lys	Tyr	Phe	Lys	Arg	Phe	Gly	Val	Gln	Val	Asp	Tyr	Val	Pro	130	135	140	
Leu	Val	Asp	Leu	Ala	Gly	Trp	Glu	Lys	Ala	Ile	Lys	Ala	Asn	Thr	Arg	145	150	155	160
Leu	Leu	Ile	Val	Glu	Ser	Pro	Ser	Asn	Pro	Leu	Ala	Glu	Leu	Val	Asp	165	170	175	
Ile	Thr	Ala	Leu	Ser	Glu	Ile	Ala	His	Ala	His	Gly	Ala	Met	Leu	Val	180	185	190	
Val	Asp	Asn	Cys	Phe	Ser	Thr	Pro	Ala	Leu	Gln	Gln	Pro	Leu	Lys	Leu	195	200	205	
Gly	Ala	Asp	Ile	Val	Phe	His	Ser	Ala	Thr	Lys	Phe	Ile	Asp	Gly	Gln	210	215	220	
Gly	Arg	Cys	Met	Gly	Gly	Val	Val	Ala	Gly	Arg	Ala	Glu	Gln	Met	Lys	225	230	235	240
Glu	Val	Val	Gly	Phe	Leu	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Phe	245	250	255	
Asn	Ala	Trp	Ile	Phe	Thr	Lys	Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Met	260	265	270	
Arg	Ala	His	Cys	Glu	Ser	Ala	Gln	Ala	Leu	Ala	Glu	Trp	Leu	Glu	Gln	275	280	285	
Gln	Asp	Gly	Val	Glu	Lys	Val	His	Tyr	Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	290	295	300	
Gln	His	Ala	Leu	Ala	Lys	Arg	Gln	Met	Ser	Gly	Phe	Gly	Ala	Val	Val	305	310	315	320
Ser	Phe	Glu	Val	Lys	Gly	Gly	Lys	Glu	Gly	Ala	Trp	Arg	Phe	Ile	Asp	325	330	335	
Ala	Thr	Arg	Val	Ile	Ser	Ile	Thr	Thr	Asn	Leu	Gly	Asp	Ser	Lys	Thr	340	345	350	
Thr	Ile	Ala	His	Pro	Ala	Thr	Thr	Ser	His	Gly	Arg	Leu	Ser	Pro	Gln	355	360	365	
Glu	Arg	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Arg	Asp	Ser	Leu	Ile	Arg	Val	Ala	Val	370	375	380	
Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Ala	Asp	Leu	Gln	Ala	Asp	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	385	390	395	400

Ala Ala Leu

5 <210> 55
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas putida*
 <400> 55

Met	Lys	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Phe	Ser	Pro	Asp	Pro	1	5	10	15
Thr	Thr	Lys	Ala	Val	Ala	Val	Pro	Ile	Tyr	Gln	Thr	Thr	Ser	Phe	Ala	20	25	30	
Phe	Asp	Asp	Thr	Gln	His	Gly	Ala	Asp	Leu	Phe	Asp	Leu	Lys	Val	Ala	35	40	45	
Gly	Asn	Ile	Tyr	Ser	Arg	Ile	Met	Asn	Pro	Thr	Asn	Asp	Val	Leu	Glu	50	55	60	
Gln	Arg	Met	Ala	Ala	Leu	Glu	Gly	Gly	Val	Gly	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	65	70	75	80
Ser	Gly	Met	Ala	Ala	Ile	Thr	Tyr	Ala	Ile	Gln	Thr	Val	Ala	Glu	Ala	85	90	95	
Gly	Asp	Asn	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Leu	Tyr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Asn	100	105	110	
Leu	Leu	Ala	His	Thr	Leu	Pro	Arg	Met	Gly	Ile	His	Thr	Arg	Phe	Ala	115	120	125	
Ala	His	Asp	Asp	Ile	Ala	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Ile	Asp	Ala	Arg	Thr	130	135	140	
Lys	Ala	Val	Phe	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asn	Pro	Ala	Gly	Asn	Ile	Val	145	150	155	160
Asp	Ile	Ala	Ala	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	His	Arg	His	Gly	Val	Pro	Leu	165	170	175	
Ile	Val	Asp	Asn	Thr	Val	Ala	Thr	Pro	Val	Leu	Cys	Arg	Pro	Phe	Glu	180	185	190	
His	Gly	Ala	Asp	Ile	Val	Val	His	Ser	Leu	Thr	Lys	Tyr	Ile	Gly	Gly	195	200	205	
His	Gly	Thr	Ser	Ile	Gly	Gly	Ile	Val	Ile	Asp	Ser	Gly	Lys	Phe	Pro	210	215	220	
Trp	Ala	Glu	Asn	Lys	Glu	Arg	Phe	Ala	Leu	Leu	Asn	Thr	Pro	Asp	Pro	225	230	235	240
Ser	Tyr	His	Gly	Val	Thr	Tyr	Thr	Glu	Ala	Phe	Gly	Pro	Ala	Ala	Phe	245	250	255	
Ile	Gly	Arg	Cys	Arg	Val	Val	Pro	Leu	Arg	Asn	Thr	Gly	Ala	Ala	Leu	260	265	270	
Ser	Pro	Phe	Asn	Ala	Phe	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala				

275	280	285
Leu Arg Met Glu Arg His Thr Glu Asn Ala Leu Lys Val Ala His Tyr		
290	295	300
Leu Gln Ala His Glu Gln Val Ala Trp Val Lys Phe Ala Gly Leu Pro		
305	310	315
Asp His Pro Glu His Ala Leu Ala Gln Arg Tyr Thr Gly Gly Lys Pro		
325	330	335
Ala Ser Ile Leu Ser Phe Gly Ile Lys Gly Gly Gln Ala Ala Gly Ala		
340	345	350
Arg Phe Ile Asp Ala Leu Gln Leu Val Val Arg Leu Val Asn Ile Gly		
355	360	365
Asp Ala Lys Ser Leu Ala Cys His Pro Ala Ser Thr Thr His Arg Gln		
370	375	380
Leu Asn Asp Asp Glu Leu Glu Lys Ala Gly Val Pro Arg Asp Met Val		
385	390	395
Arg Leu Ser Ile Gly Ile Glu His Ser Asp Asp Ile Ile Ala Asp Leu		
405	410	415
Ala Gln Ala Leu Glu Ala Ser Arg Gly		
420	425	

<210> 56
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> *Chromobacterium violaceum*
 <400> 56

ES 2 595 453 T3

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

Arg	Glu	Ala	Leu	Arg	Pro	Asn	Thr	Lys	Leu	Leu	Phe	Leu	Glu	Thr	Pro	145	150	155	160
Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Glu	Val	Ala	Asp	Ile	Ala	Ala	Ile	Ala	Asp	Ile	165	170	175	
Ala	His	Ala	His	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Ser	Phe	Cys	Ser	180	185	190	
Pro	Ala	Leu	Gln	Gln	Pro	Leu	Lys	Leu	Gly	Ala	Asp	Leu	Val	Met	His	195	200	205	
Ser	Ala	Thr	Lys	Phe	Ile	Asp	Gly	His	Gly	Arg	Val	Met	Gly	Gly	Ala	210	215	220	
Val	Val	Gly	Ser	Asp	Lys	Leu	Val	Glu	Gln	Val	Tyr	Leu	His	Val	Arg	225	230	235	240
Ala	Ala	Gly	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Phe	Asn	Ala	Trp	Thr	Leu	Leu	Ser	245	250	255	
Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	His	Leu	Arg	Met	Glu	Lys	His	Ser	Ala	Asn	Ala	260	265	270	
Leu	Glu	Leu	Ala	Arg	Trp	Leu	Glu	Ala	Gln	Pro	Asn	Val	Glu	Arg	Val	275	280	285	
Tyr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Glu	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Ala	Leu	Arg	290	295	300	
Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Gly	Ala	Val	Val	Ser	Phe	Val	Val	Lys	Gly	Gly	305	310	315	320
Arg	Lys	Ala	Ala	Trp	Lys	Val	Val	Asp	Ala	Val	Arg	Val	Ile	Ser	Arg	325	330	335	
Thr	Ala	Asn	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Ala	Ser	340	345	350	
Thr	Thr	His	Ala	Arg	Val	Thr	Gln	Glu	Ala	Arg	Glu	Arg	Ala	Gly	Ile	355	360	365	
Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Arg	Val	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Asn	Val	Arg	Asp	370	375	380	
Leu	Gln	Gln	Asp	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Asp							385	390		

<210> 57
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> *Nocardia farcinica*

 <400> 57

ES 2 595 453 T3

Val	Ile	Thr	Gly	Gly	Ala	Phe	Asp	Lys	Pro	Leu	Pro	Glu	Gly	Val	Gly
1				5					10					15	
Pro	Ala	Thr	Leu	Gly	Val	Arg	Gly	Gly	Leu	Arg	Arg	Ser	Gly	Phe	Glu
			20					25					30		
Glu	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Thr	Ser	Gly	Phe	Val	Tyr	Glu	Ser
		35					40					45			

Ala 50	Glu	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala 55	Phe	Thr	Gly	Glu	Val 60	Glu	His	Phe	Val
Tyr 65	Ser	Arg	Tyr	Gly	Asn 70	Pro	Thr	Val	Ala	Met 75	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile 80
Arg	Leu	Met	Asp	Gly 85	Ala	Glu	Ala	Ala	Phe 90	Ala	Thr	Ala	Ser	Gly 95	Met
Ser	Ala	Val	Phe 100	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala 105	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly 110	Asp	Arg
Leu	Val	Ala 115	Ala	Arg	Ser	Leu	Phe 120	Gly	Ser	Cys	Phe	Val 125	Val	Cys	Asn
Glu 130	Ile	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly 135	Val	Glu	Thr	Val	Phe 140	Val	Asp	Gly	Glu
Asp 145	Leu	Asp	Gln	Trp	Glu 150	Arg	Ala	Leu	Ser	Val 155	Pro	Thr	Ala	Ala	Val 160
Phe	Phe	Glu	Thr	Pro 165	Ala	Asn	Pro	Met	Gln 170	Thr	Leu	Val	Asp	Val 175	Arg
Arg	Val	Thr	Glu 180	Leu	Ala	His	Ala 185	Ala	Gly	Ala	Lys	Val 190	Val	Leu	Asp
Asn	Val	Phe 195	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu 200	Gln	Lys	Gly	Phe	Asp 205	Leu	Gly	Ala
Asp 210	Val	Val	Val	Tyr	Ser	Gly 215	Thr	Lys	His	Ile	Asp 220	Gly	Gln	Gly	Arg
Val 225	Leu	Gly	Gly	Ala 230	Ile	Leu	Gly	Asp	Arg	Glu 235	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro 240
Val	Lys	Thr	Leu	Met 245	Arg	His	Thr	Gly	Pro 250	Ala	Leu	Ser	Pro	Phe 255	Asn
Ala	Trp	Thr	Leu 260	Leu	Lys	Gly	Leu	Glu 265	Thr	Met	Pro	Leu	Arg 270	Val	Arg
His	Ser	Thr 275	Glu	Ser	Ala	Leu	Arg 280	Ile	Ala	Arg	Phe	Leu 285	Glu	Ser	Asn
Pro	Ala 290	Val	Ser	Trp	Val	Lys 295	Tyr	Pro	Phe	Leu	Glu 300	Ser	His	Pro	Gln
Tyr 305	Asp	Leu	Ala	Arg	Ala 310	Gln	Met	Ser	Gly	Gly 315	Gly	Thr	Val	Val	Thr 320
Phe	Glu	Leu	Lys 325	Ala	Ala	Glu	Gly	Glu	Ala 330	Lys	Lys	Arg	Ala	Phe 335	Glu
Val	Leu	Asp 340	Arg	Leu	Arg	Ile	Ile	Asp 345	Ile	Ser	Asn	Asn	Leu 350	Gly	Asp
Ala	Lys	Thr 355	Leu	Ile	Thr	His	Pro 360	Ala	Thr	Thr	Thr	His 365	Arg	Ala	Met
Gly	Pro 370	Glu	Gly	Arg	Ala	Gly 375	Ile	Gly	Leu	Thr	Asp 380	Gly	Val	Val	Arg

Ile Ser Val Gly Leu Glu Asp Val Asp Asp Leu Leu Ser Asp Leu Glu
385 390 395 400

His Ala Leu Ser

<210> 58
<211> 417
<212> PRT
<213> *Bradyrhizobium Japonicum*
<400> 58

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

260						265						270					
Trp	Val	Leu	Leu	Lys	Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Val	Arg	Val	Arg	Ala		
		275					280						285				
Gln	Thr	Asp	Thr	Ala	Ala	Ser	Val	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Gly	His	Pro		
	290						295				300						
Lys	Ile	Ser	Arg	Leu	Ile	Tyr	Pro	Gly	Arg	Ala	Asp	His	Pro	Gln	Ala		
305					310					315					320		
Ala	Leu	Val	Lys	Lys	Gln	Met	Arg	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Val	Gly	Phe		
				325					330					335			
Glu	Val	Lys	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Ala	Phe	Arg	Val	Leu	Asn	Glu	Leu		
			340					345					350				
Lys	Leu	Ala	Lys	Ile	Ser	Asn	Asn	Leu	Gly	Asp	Ala	Lys	Ser	Leu	Val		
		355					360					365					
Thr	His	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	His	Gln	Arg	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Arg		
	370						375				380						
Ala	Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	Glu	Gly	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Ala	Gly	Leu		
385					390					395					400		
Glu	His	Ala	Asp	Asp	Leu	Ile	Glu	Asp	Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys		
				405					410					415			

Ala

<210> 59
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> *Hyphomonas Neptunium*
 <400> 59

ES 2 595 453 T3

Met	Ala	Asp	Ala	Pro	Gly	Gly	Asp	Lys	Lys	Gly	Trp	Lys	Pro	Ala	Thr
1				5					10					15	
Gln	Ala	Val	Arg	Gly	Gly	Leu	Met	Arg	Ser	Gln	His	Gly	Glu	Ile	Ser
			20					25					30		
Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Ser	Ala	Glu	Gln
		35					40					45			
Ala	Met	Arg	Arg	Met	Ala	Gly	Glu	Glu	Glu	Gly	Phe	Val	Tyr	Ser	Arg
	50					55					60				
Tyr	Gly	Ser	Pro	Thr	Asn	Glu	Met	Leu	Gln	Gln	Arg	Leu	Ala	Leu	Ile
65					70					75					80
Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Cys	Arg	Val	Thr	Gly	Ser	Gly	Met	Gly	Ala	Ile
				85					90					95	
Ser	Ser	Ala	Ile	Leu	Ala	Pro	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Ala
			100					105					110		
Ala	Thr	Ala	Leu	Phe	Gly	Ser	Cys	Arg	Trp	Ile	Ile	Ala	Asn	Gln	Met
	115						120					125			

```

Pro Lys Phe Gly Ile Glu Ala Val Phe Val Asp Gly Ala Asp Leu Asp
 130                      135                      140

Ala Trp Lys Arg Glu Ile Asp Lys Gly Cys Gln Leu Val Leu Ile Glu
 145                      150                      155                      160

Ser Pro Ala Asn Pro Leu Leu Asp Gly Val Asp Ile Glu Ala Val Ala
      165                      170                      175

Arg Leu Ala Lys Ala Ala Gly Ala Leu Leu Val Val Asp Asn Val Phe
      180                      185                      190

Ala Thr Pro Val Leu Gln Arg Pro Leu Glu Met Gly Ala Asp Val Ile
      195                      200                      205

Ala Tyr Ser Ala Thr Lys His Met Asp Gly Gln Gly Arg Val Leu Leu
      210                      215                      220

Gly Ala Ile Leu Thr Asp Ala Lys Arg Met Ser Asp Val Tyr Asp Pro
 225                      230                      235                      240

Trp Leu Arg His Met Gly Pro Ala Ala Ser Pro Phe Asn Ala Trp Val
      245                      250                      255

Val Leu Lys Gly Leu Glu Thr Met Gln Leu Arg Val Glu Ala Gln Ser
      260                      265                      270

Arg Thr Ala Ala Arg Leu Ala Asp Val Leu Ala Asp His Pro Ala Val
      275                      280                      285

Asn Ala Val Arg Tyr Pro His Arg Lys Asp His Pro His Tyr Glu Val
      290                      295                      300

His Lys Arg Gln Met Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Ala Leu Ser Leu
 305                      310                      315                      320

Lys Gly Gly Gln Asp Ala Ala Phe Arg Phe Leu Asn Gly Leu Gln Leu
      325                      330                      335

Val Asp Ile Cys Asn Asn Leu Gly Asp Thr Lys Ser Leu Ala Cys His
      340                      345                      350

Pro Ser Thr Thr Thr His Arg Ala Leu Ser Asp Glu Asp Gln Ala Ala
      355                      360                      365

Met Gly Leu Asp Arg Ser Trp Val Arg Leu Ser Val Gly Leu Glu Asp
      370                      375                      380

Ala Asp Asp Leu Glu Ala Asp Leu Leu Ala Ser Leu Asn Ser Leu
 385                      390                      395

```

<210> 60
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> *Methylococcus Capsulatus*

<400> 60

ES 2 595 453 T3

Met	Glu	Thr	Arg	Ala	Val	Arg	Ala	Gly	Gln	Arg	Arg	Thr	Met	Glu	Gln
1				5				10					15		
Glu	His	Ala	Glu	Pro	Ile	Phe	Ala	Thr	Ser	Ser	Tyr	Val	Phe	Ala	Ser
			20					25					30		

Ala Ala Glu Ala Ala Glu Arg Phe Ala Gly Lys Ala Ala Gly Asn Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Arg Phe Thr Asn Pro Thr Val Arg Thr Phe Glu Glu Arg Leu
 50 55 60
 Ala Ala Leu Glu Gly Gly Glu Arg Cys Val Ala Val Gly Ser Gly Met
 65 70 75 80
 Ala Ala Ile Ala Ser Thr Ala Phe Gly Leu Leu Lys Ala Gly Asp His
 85 90 95
 Val Val Cys Ser Arg Ser Val Phe Gly Asn Thr Thr Leu Leu Phe Gln
 100 105 110
 Asn Tyr Leu Ala Lys Phe Gly Val Pro Thr Thr Phe Val Gly Leu Thr
 115 120 125
 Asp Tyr Asp Gly Trp Ala Ala Ala Ile Arg Pro Glu Thr Arg Phe Leu
 130 135 140
 Phe Ile Glu Thr Pro Ser Asn Pro Leu Thr Glu Ile Ala Asp Ile Pro
 145 150 155 160
 Arg Leu Ala Glu Ile Ala His Ser Arg Gly Cys Leu Leu Val Val Asp
 165 170 175
 Asn Cys Phe Cys Thr Pro Ala Leu Gln Arg Pro Leu Ala Leu Gly Ala
 180 185 190
 Asp Ile Val Ile His Ser Ala Thr Lys Tyr Leu Asp Gly Gln Gly Arg
 195 200 205
 Cys Val Gly Gly Ala Ile Val Gly Gly Arg Glu Leu Leu Asp Ala Glu
 210 215 220
 Ile Tyr Pro Phe Leu Arg Thr Gly Gly Pro Ser Met Ser Pro Phe Asn
 225 230 235 240
 Ala Trp Val Phe Leu Lys Gly Leu Glu Thr Leu Asn Leu Arg Met Lys
 245 250 255
 Ala His Cys Glu Asn Ala Leu Gly Leu Ala Arg Trp Leu Glu Ala Gln
 260 265 270
 Pro Trp Val Glu Arg Val His Tyr Pro Gly Leu Ala Ser His Pro Gln
 275 280 285
 His Glu Leu Ala Ala Arg Gln Gln Ser Gly Phe Gly Gly Ile Val Ser
 290 295 300
 Phe Glu Val Lys Gly Gly Gln Glu Ala Ala Trp Arg Leu Ile Asp Ser
 305 310 315 320
 Thr Arg Leu Leu Ser Ile Thr Gly Asn Leu Gly Asp Ala Lys Thr Thr
 325 330 335
 Ile Thr His Pro Ala Thr Thr Thr His Gly Arg Leu Ser Pro Glu Ala
 340 345 350
 Arg Ala Ala Ala Gly Ile Ala Asp Gly Leu Ile Arg Ile Ala Val Gly
 355 360 365

Leu Glu Asn Leu Ala Asp Ile Gln Ala Asp Leu Ala Arg Phe Ala
370 375 380

<210> 61
<211> 392
<212> PRT
<213> *Methylobacillus Flagellatus*

<400> 61

Met	Ser	Gln	His	Glu	Trp	His	Ala	Glu	Thr	Leu	Gly	Val	Arg	Ala	Gly	1	5	10	15
Ser	Glu	His	Thr	Pro	Phe	Gly	Glu	Asn	Ser	Glu	Ala	Met	Phe	Leu	Thr	20	25	30	
Ser	Ser	Phe	Val	Phe	Glu	Asn	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Gly	35	40	45		
Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Asn	Ile	Tyr	Ser	Arg	Phe	Thr	Asn	Pro	Thr	Val	50	55	60	
Ser	Met	Phe	Gln	Asn	Lys	Leu	Ala	Ala	Leu	Glu	Gly	Ala	Glu	Phe	Cys	65	70	75	80
Val	Ala	Thr	Ser	Ser	Gly	Met	Ser	Ala	Ile	Leu	Ala	Cys	Val	Met	Gly	85	90	95	
Val	Cys	Ser	Ala	Gly	Asp	His	Val	Val	Ala	Ser	Arg	Ser	Ile	Phe	Gly	100	105	110	
Thr	Ser	Val	Gln	Leu	Phe	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys	Arg	Trp	Gly	Leu	Glu	115	120	125	
Thr	Thr	Phe	Val	Gln	Leu	Ser	Asp	Pro	Glu	Ala	Trp	Thr	Ala	Ala	Val	130	135	140	
Lys	Pro	Asn	Thr	Lys	Leu	Phe	Phe	Leu	Glu	Thr	Pro	Ser	Asn	Pro	Leu	145	150	155	160
Thr	Glu	Ile	Cys	Asp	Ile	Ala	Val	Val	Ala	Glu	Ile	Ala	His	Gln	Ala	165	170	175	
Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Asp	Asn	Cys	Phe	Cys	Thr	Pro	Ala	Leu	Gln	180	185	190	
Lys	Pro	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Val	Val	His	Ser	Ala	Thr	Lys	195	200	205	
Tyr	Ile	Asp	Gly	Gln	Gly	Arg	Cys	Leu	Gly	Gly	Ala	Val	Leu	Gly	Arg	210	215	220	
Lys	Asp	Val	Leu	Glu	Pro	Val	Tyr	Gly	Phe	Leu	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	225	230	235	240
Thr	Met	Ser	Ala	Phe	Asn	Ala	Trp	Val	Phe	Leu	Lys	Gly	Leu	Glu	Thr	245	250	255	
Leu	His	Leu	Arg	Met	Glu	Ala	His	Ala	Arg	Asn	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	260	265	270	

ES 2 595 453 T3

Gln	Trp	Leu	Glu	Gln	Gln	Pro	Arg	Val	Glu	Arg	Val	Tyr	Tyr	Pro	Gly
		275					280					285			
Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	Tyr	Ala	Leu	Ala	Gln	Lys	Gln	Gln	Lys	Ser
	290					295					300				
Gly	Gly	Ala	Ile	Val	Ser	Phe	Asp	Val	Lys	Gly	Gly	Gln	Pro	Ala	Ala
305					310					315					320
Trp	His	Leu	Ile	Asp	Ala	Thr	Arg	Met	Leu	Ser	Ile	Thr	Ala	Asn	Leu
				325					330					335	
Gly	Asp	Ala	Lys	Ser	Thr	Ile	Thr	His	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	His	Ser
			340					345					350		
Arg	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Gly	Asp	Gly	Leu
		355					360					365			
Val	Arg	Ile	Ala	Val	Gly	Leu	Glu	His	Ile	Asp	Asp	Ile	Lys	Ala	Asp
	370					375					380				
Leu	Ala	Trp	Leu	Gly	His	Gln	Asp								
385					390										

<210> 62
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> *Nitrosomonas Europaea*
 <400> 62

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

165										170					175				
Val	Trp	Leu	Ala	Val	Asp	Asn	Cys	Phe	Cys	Thr	Pro	Ile	Ile	Gln	Gln				
			180					185					190						
Pro	Leu	Lys	Leu	Gly	Ala	Asp	Leu	Val	Ile	His	Ser	Ala	Thr	Lys	Tyr				
		195					200					205							
Leu	Asp	Gly	Gln	Gly	Arg	Val	Leu	Gly	Gly	Ala	Ile	Leu	Gly	Lys	Arg				
	210					215					220								
Asp	Leu	Leu	Met	Asp	Ser	Gly	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Arg	Thr	Ala	Gly				
225					230					235					240				
Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Phe	Asn	Ala	Trp	Ile	Ile	Leu	Lys	Gly	Met	Glu				
				245					250					255					
Thr	Leu	Ser	Leu	Arg	Val	Lys	Ala	His	Ser	Asp	His	Ala	Leu	Glu	Val				
			260					265					270						
Ala	Arg	Trp	Leu	Glu	Thr	His	Pro	Arg	Val	Gly	Arg	Val	Phe	Tyr	Pro				
		275					280					285							
Gly	Leu	Pro	Ser	His	Pro	Gln	His	Glu	Leu	Ala	Met	Arg	Gln	Gln	Lys				
	290					295					300								
Thr	Gly	Gly	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Glu	Val	Lys	Gly	Gly	Arg	Glu	Ala				
305					310					315					320				
Ala	Trp	Arg	Val	Val	Asp	Ala	Ala	Arg	Leu	Met	Ser	Ile	Thr	Ala	Asn				
				325					330					335					
Leu	Gly	Asp	Thr	Lys	Ser	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	His				
			340					345					350						
Gly	Arg	Ile	Ser	Gln	Glu	Ala	Arg	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Arg	Asp	Gly				
		355					360					365							
Leu	Leu	Arg	Ile	Ala	Val	Gly	Leu	Glu	Ser	Pro	Asp	Asp	Leu	Lys	Ala				
	370					375					380								
Asp	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Gln													
385					390														

<210> 63
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> *Klesiella pneumoniae*
 <400> 63

ES 2 595 453 T3

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

Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile
 65 70 75 80
 Leu Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala
 85 90 95
 Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala
 100 105 110
 Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Gln Phe Val Asp Gln Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu
 130 135 140
 Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys
 145 150 155 160
 Gly Leu Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ile Ser Val Val Asp Asn Thr Phe
 165 170 175
 Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val
 180 185 190
 Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala
 195 200 205
 Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Thr Thr Val Thr Glu Leu Ala Trp
 210 215 220
 Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Ser Ala Phe Asp Ser Tyr Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Ser Pro Arg Met Glu Val Ala Gln
 245 250 255
 Arg Asn Ala Leu Ala Ile Val Glu Tyr Leu Lys Thr Gln Pro Leu Val
 260 265 270
 Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile
 275 280 285
 Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu
 290 295 300
 Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Ser Gly Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His
 325 330 335
 Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala
 340 345 350
 Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp
 355 360 365
 Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn
 370 375 380
 Glu Glu
 385

5
<210> 64
<211> 373
<212> PRT
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 64

Met	Ser	Gln	His	Val	Glu	Thr	Lys	Leu	Ala	Gln	Ile	Gly	Asn	Arg	Ser		
1				5					10					15			
Asp	Glu	Val	Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Ala	Pro	Ile	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ala		
			20					25					30				
Tyr	Arg	His	Arg	Gly	Ile	Gly	Glu	Ser	Thr	Gly	Phe	Asp	Tyr	Val	Arg		
		35					40					45					
Thr	Lys	Asn	Pro	Thr	Arg	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Ala	Ile	Ala	Asn	Leu		
	50					55					60						
Glu	Asn	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Ala	Phe	Ser	Ser	Gly	Met	Ala	Ala	Ile		
65					70					75					80		
Gln	Thr	Ile	Met	Ala	Leu	Phe	Lys	Ser	Gly	Asp	Glu	Leu	Ile	Val	Ser		
				85					90					95			
Ser	Asp	Leu	Tyr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Arg	Leu	Phe	Glu	Asn	Glu	Trp	Lys		
		100						105					110				
Lys	Tyr	Gly	Leu	Thr	Phe	His	Tyr	Asp	Asp	Phe	Ser	Asp	Glu	Asp	Cys		
		115					120					125					
Leu	Arg	Ser	Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Thr	Lys	Ala	Val	Phe	Val	Glu	Thr		
130						135					140						
Pro	Thr	Asn	Pro	Leu	Met	Gln	Glu	Ala	Asp	Ile	Glu	His	Ile	Ala	Arg		
145					150					155					160		
Ile	Thr	Lys	Glu	His	Gly	Leu	Leu	Leu	Ile	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Tyr		
				165					170					175			
Thr	Pro	Val	Leu	Gln	Arg	Pro	Leu	Glu	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Val	Ile		
			180					185					190				
His	Ser	Ala	Thr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Gly	His	Asn	Asp	Leu	Leu	Ala	Gly		
		195				200						205					
Leu	Val	Val	Val	Lys	Asp	Glu	Arg	Leu	Gly	Glu	Glu	Met	Phe	Gln	His		
210						215					220						
Gln	Asn	Ala	Ile	Gly	Ala	Val	Leu	Pro	Pro	Phe	Asp	Ser	Trp	Leu	Leu		
225					230					235					240		
Met	Arg	Gly	Met	Lys	Thr	Leu	Ser	Leu	Arg	Met	Arg	Gln	His	Gln	Ala		
				245				250						255			
Asn	Ala	Gln	Glu	Leu	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Gln	Glu	Glu	Ile	Ser		
			260					265					270				
Asp	Val	Leu	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Met	Leu	Ser	Phe	Arg	Leu	Gln		
		275					280					285					
Lys	Glu	Glu	Trp	Val	Asn	Pro	Phe	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	Ile	Cys		
290						295					300						

ES 2 595 453 T3

Phe	Ala	Glu	Ser	Leu	Gly	Gly	Val	Glu	Ser	Phe	Ile	Thr	Tyr	Pro	Ala
305					310					315					320
Thr	Gln	Thr	His	Met	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ile	Ala	Asn	Gly
				325					330					335	
Val	Cys	Asn	Arg	Leu	Leu	Arg	Phe	Ser	Val	Gly	Ile	Glu	His	Ala	Glu
			340					345					350		
Asp	Leu	Lys	Glu	Asp	Leu	Lys	Gln	Ala	Leu	Cys	Gln	Val	Lys	Glu	Gly
		355					360					365			
Ala	Val	Ser	Phe	Glu											
				370											

<210> 65
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> *Shigella flexneri* 2457T

<400> 65

ES 2 595 453 T3

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

210	215	220
Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu 225 230 235 240		
Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln 245 250 255		
Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val 260 265 270		
Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile 275 280 285		
Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu 290 295 300		
Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Cys Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu 305 310 315 320		
Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His 325 330 335		
Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala 340 345 350		
Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp 355 360 365		
Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn 370 375 380		
Lys Gly 385		

<210> 66
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> *Colwellia Psychrerythraea*
 <400> 66

ES 2 595 453 T3

Met	Ser	Ile	Thr	Lys	Lys	Gly	Asn	Ile	Thr	Thr	Ser	Ala	Val	Arg	Ala	
1				5					10					15		
Gly	Ile	Asn	Thr	Asp	Gln	Gln	His	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Pro	Ile	Tyr	
			20					25					30			
Leu	Ser	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Lys	Gly	Phe	Asn	Asn	Lys	Arg	Gln	Phe	
		35					40					45				
Asp	Tyr	Ser	Arg	Thr	Gly	Asn	Pro	Thr	Arg	Ala	Thr	Phe	Ala	Gly	Ala	
	50					55					60					
Ile	Ala	Glu	Leu	Glu	Gln	Gly	Ser	Val	Gly	Ile	Val	Thr	Ser	Thr	Gly	
65					70					75					80	
Met	Ala	Ala	Val	His	Leu	Ile	Cys	Gln	Leu	Leu	Ser	Thr	Gln	Asp	Thr	
				85					90					95		
Val	Val	Ile	Pro	His	Asp	Cys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Leu	Phe	Thr	
			100					105					110			

```

His Leu Ala Lys Arg Gly Gln Phe Lys Leu Ile Val Val Asp Gln Asn
 115                      120                      125

Asp Gln Gln Ala Leu Asp Asn Ala Leu Ala His Lys Pro Lys Leu Val
 130                      135                      140

Leu Leu Glu Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Leu Val Asp Ile Glu
 145                      150                      155                      160

Val Val Thr Lys Ala Cys His Ala Val Gly Ala Leu Val Ala Val Asp
                      165                      170                      175

Asn Thr Phe Leu Ser Pro Ala Leu Gln Gln Pro Leu Thr Leu Gly Ala
 180                      185                      190

Asp Ile Val Phe His Ser Thr Thr Lys Tyr Ile Asn Gly His Ser Asp
 195                      200                      205

Val Val Gly Gly Val Val Val Ala Lys Thr Glu Glu Leu Gly Glu Gln
 210                      215                      220

Leu Ala Trp Trp Ala Asn Cys Ile Gly Ile Thr Gly Ser Ala Phe Asp
 225                      230                      235                      240

Ser Phe Leu Ala Leu Arg Gly Leu Lys Thr Leu Pro Val Arg Met Lys
                      245                      250                      255

Gln His Gln Glu Asn Ala Leu Arg Val Ala Asp Phe Leu Lys Asn His
                      260                      265                      270

Asp Ala Ile Asp Ala Ile Tyr Phe Pro Gly Phe Pro Glu His Thr Gly
 275                      280                      285

His His Ile Ala Lys Lys Gln Gln Tyr Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser
 290                      295                      300

Phe Glu Ile Lys Gly Asp Val Glu Ala Val Lys Lys Leu Phe Glu Asn
 305                      310                      315                      320

Leu Glu Leu Phe Thr Leu Ala Gln Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu
                      325                      330                      335

Ile Ser His Pro Ser Thr Met Thr His Ala Gly Met Thr Ile Pro Asp
                      340                      345                      350

Gln Leu Glu Ala Gly Ile Thr Gln Ser Leu Val Arg Ile Ser Val Gly
                      355                      360                      365

Ile Glu Asp Ile Asp Asp Ile Leu Ala Asp Leu Ala His Gly Leu Thr
 370                      375                      380

Gln Ser Gln Leu
385

```

<210> 67

<211> 386

<212> PRT

<213> *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A

<400> 67

ES 2 595 453 T3

Met	Thr	Arg	Lys	Gln	Ala	Thr	Ile	Ala	Val	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Asp
1				5					10					15	

Asp Glu Gln Tyr Gly Cys Val Val Pro Pro Ile His Leu Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Asn Phe Thr Gly Phe Asn Glu Pro Arg Ala His Asp Tyr Ser Arg
 35 40 45
 Arg Gly Asn Pro Thr Arg Asp Val Val Gln Arg Ala Leu Ala Glu Leu
 50 55 60
 Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile
 65 70 75 80
 His Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala
 85 90 95
 Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala
 100 105 110
 Thr Arg Gly Cys Tyr Cys Val Arg Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Arg
 115 120 125
 Ala Leu Gln Ala Ala Leu Glu Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu
 130 135 140
 Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys
 145 150 155 160
 Arg Leu Ala Arg Glu Ala Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe
 165 170 175
 Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val
 180 185 190
 Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala
 195 200 205
 Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Ala Trp
 210 215 220
 Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln
 245 250 255
 Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val
 260 265 270
 Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile
 275 280 285
 Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu
 290 295 300
 Asp Gly Asp Glu Glu Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His
 325 330 335
 Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ser Pro Gln Ala Arg Ala Ala
 340 345 350

ES 2 595 453 T3

Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp
355 360 365

Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Gly Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn
370 375 380

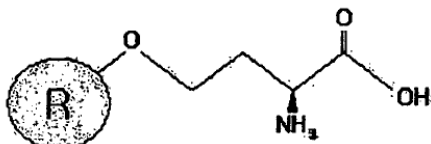
Lys Gly
385

5	<210> 68 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
10	<400> 68 catatgccca ccctcgcgcc20 <210> 69 <211> 25 <212> ADN <213> <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
15	<400> 69 aagcttttag atgtagaact cgatg25 <210> 70 <211> 70 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
20	<400> 70	
25	caatttcttg cgtgaagaaa acgtctttgt gatgacaact tctcgtgogt gtgtaggctg gagctgcttc	60 70
30	<210> 71 <211> 70 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i> <400> 71 aatccagcgt tggattcatg tgccgtagat cgtatggcgt gatctggttag catatgaata tcttccttag	60 70
35		

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir L-metionina que comprende:

- 5 i) cultivar una cepa productora de precursor de L-metionina en una solución de fermentación, de tal forma que el precursor de L-metionina que es un compuesto de O-acilhomoserina de fórmula 1 se acumula en la solución de fermentación;



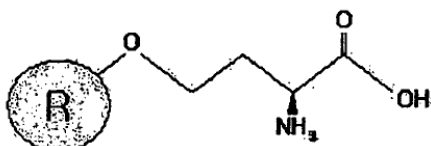
[Fórmula 1]

- 10 y
ii) añadir una enzima convertidora y metilmercaptano o sus diferentes formas a la solución de fermentación para convertir el precursor de L-metionina en L-metionina;

15 en donde R de la fórmula 1 es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono como máximo y en donde la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) se caracteriza por una expresión o actividad potenciada de homoserina O-succinil transferasa o de homoserina O-acetil transferasa.

2. Un método para producir L-metionina que comprende:

- 20 i) cultivar una cepa productora de precursor de L-metionina en una solución de fermentación, de tal forma que el precursor de L-metionina que es un compuesto de O-acilhomoserina de fórmula 1 se acumula en la solución de fermentación;



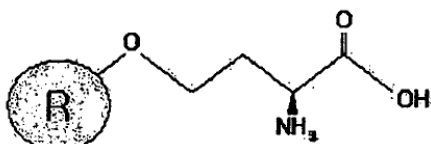
[Fórmula 1]

- 25 y
ii) añadir una enzima convertidora y metilmercaptano o sus diferentes formas a la solución de fermentación para convertir el precursor de L-metionina en L-metionina;

30 en donde R de la fórmula 1 es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono como máximo y en donde la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) se caracteriza por una actividad eliminada o debilitada de cistationina gamma sintasa o de O-succinilhomoserina sulfhidrilasa o de O-acetilhomoserina sulfhidrilasa implicada en la degradación del precursor de L-metionina.

3. Un método para producir L-metionina que comprende:

- 35 i) cultivar una cepa productora de precursor de L-metionina en una solución de fermentación, de tal forma que el precursor de L-metionina que es un compuesto de O-acilhomoserina de fórmula 1 se acumula en la solución de fermentación;



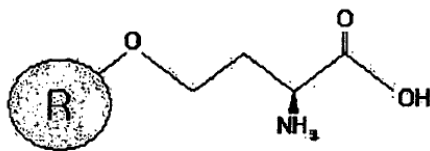
[Fórmula 1]

- 40 y
ii) añadir una enzima convertidora y metilmercaptano o sus diferentes formas a la solución de fermentación para convertir el precursor de L-metionina en L-metionina;

45 en donde R de fórmula 1 es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono como máximo y en donde la enzima convertidora y el metilmercaptano o sus diferentes formas de la etapa ii) se mezclan directamente con el sobrenadante de la solución de fermentación de la etapa i) para iniciar la reacción.

4. Un método para producir L-metionina que comprende:

i) cultivar una cepa productora de precursor de L-metionina en una solución de fermentación, de tal forma que el precursor de L-metionina, que es un compuesto de O-acilhomoserina de fórmula 1 se acumula en la solución de fermentación;



[Fórmula 1]

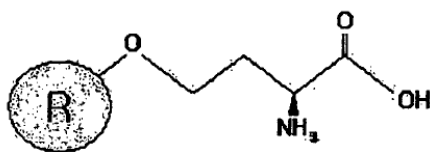
y

ii) añadir una enzima convertida y metilmercaptano o sus diferentes formas a la solución de fermentación para convertir el precursor de L-metionina en L-metionina;

en donde R de la fórmula 1 es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono como máximo y en donde la enzima convertidora procede de una cepa bacteriana recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una cistationina gamma sintasa o una O-succinilhomoserina sulfhidrilasa o una O-acetilhomoserina sulfhidrilasa.

5. Un método para producir L-metionina que comprende:

i) cultivar una cepa productora de precursor de L-metionina en una solución de fermentación, de tal forma que el precursor de L-metionina que es un compuesto de O-acilhomoserina de fórmula 1 se acumula en la solución de fermentación;



[Fórmula 1]

y

ii) añadir una enzima convertidora y metilmercaptano o sus diferentes formas a la solución de fermentación para convertir el precursor de L-metionina en L-metionina;

en donde R de la fórmula 1 es una sustancia que incluye C, H, O, N y otros compuestos con 15 átomos de carbono como máximo y en donde la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) es una cepa cuya ruta de biosíntesis de treonina, isoleucina o lisina está debilitada o suprimida.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho precursor de L-metionina es O-acetil homoserina u O-succinil homoserina.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) se selecciona entre el grupo que consiste en *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Salmonella* sp., *Brevibacterium* sp., *Hyphomonas* sp., *Chromobacterium* sp. y *Nocardia* sp. u hongos o levaduras.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) se selecciona entre *Escherichia* sp. o *Corynebacterium* sp.

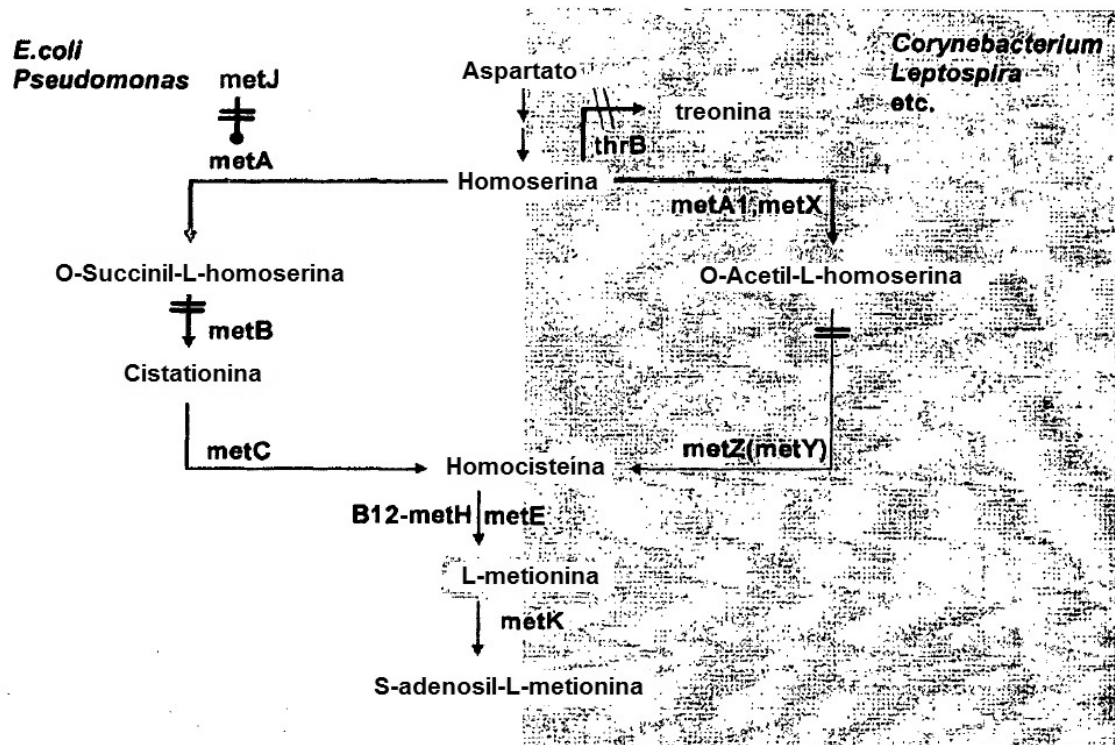
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) es *Escherichia coli*.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la cepa productora de precursor de L-metionina de la etapa i) es *Corynebacterium glutamicum*.

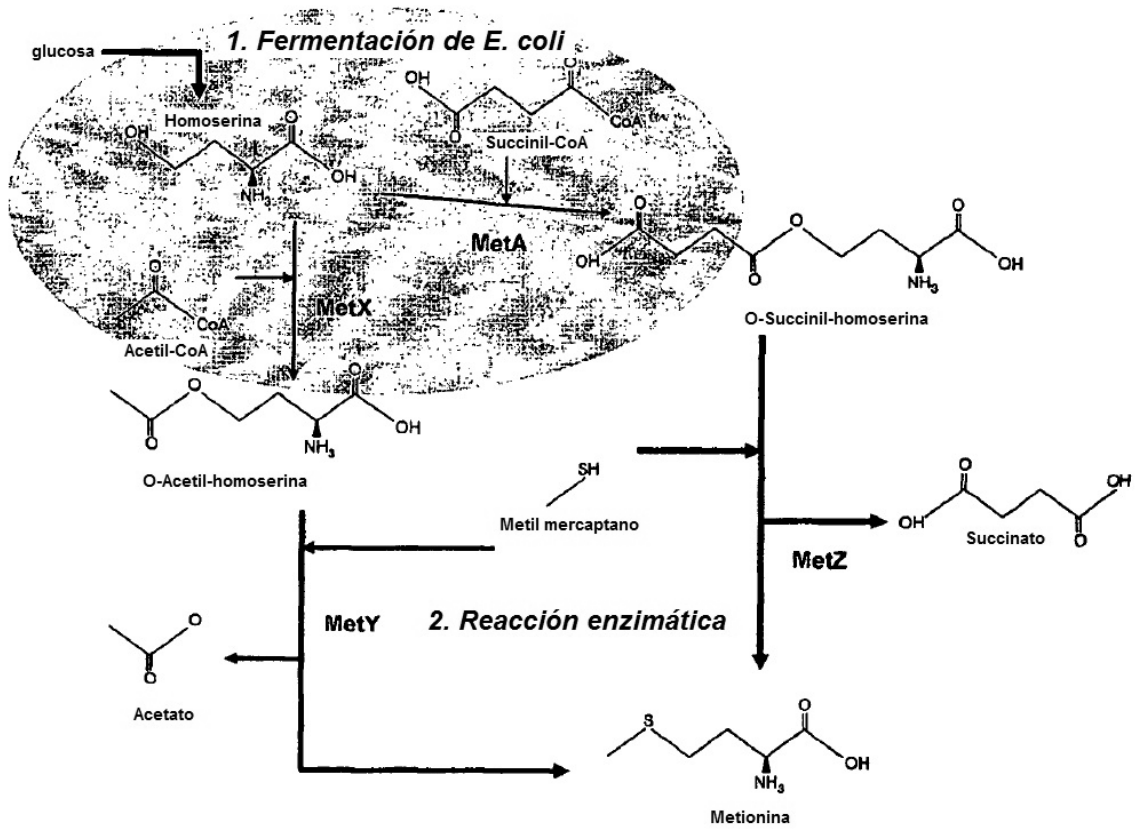
11. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la cistationina gamma sintasa o la O-succinilhomoserina sulfhidrilasa o la O-acetilhomoserina sulfhidrilasa está codificada, respectivamente, por metB o metZ o metY o sus genes mutantes.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la cepa se caracteriza por una homoserina cinasa eliminada o debilitada implicada en la ruta de la biosíntesis de treonina.
- 5 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la enzima convertidora que convierte el precursor de L-metionina en metionina de la etapa ii) se obtiene de una cepa seleccionada entre el grupo que consiste en *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Salmonella* sp., *Brevibacterium* sp., *Hyphomonas* sp., *Chromobacterium* sp. y *Nocardia* sp. u hongos o levaduras.
- 10 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la enzima convertidora se obtiene de una cepa seleccionada entre el grupo que consiste en *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aurogenosa*, *Pseudomonas putida*, *Corynebacteria glutamicum*, *Leptospira meyeri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Chromobacterium Violaceum*, *Nocardia Farcinica*, *Bradyrhizobium Japonicum*, *Hyphomonas Neptunium*, *Methylococcus Capsulatus*, *Methylobacillus Flagellatus*, *Nitrosomonas Europaea*, *Klesiella Pneumoniae*, *Bacillus Subtilis*, y *Shigella flexneri*.
- 15 15. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la enzima recombinante se produce usando una secuencia de ácido nucleico de una cepa bacteriana seleccionada entre el grupo que consiste en *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacteria* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Salmonella* sp., *Brevibacteria* sp., *Hyphomonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Nocardia* sp., hongos y levaduras.
- 20 16. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el gen que codifica a la homoserina cinasa es thrB.
- 25 17. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen que codifica la homoserina O-succinil transferasa es metA y el gen que codifica la homoserina O-acetil transferasa es metX.

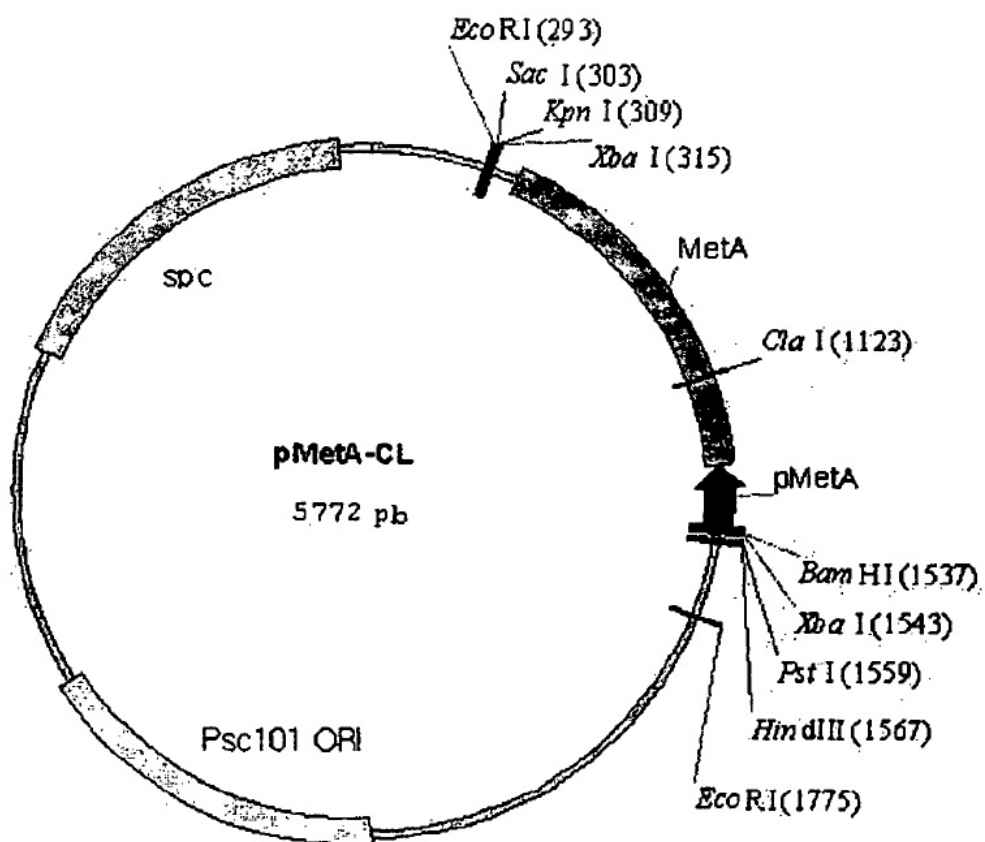
[Figura 1]



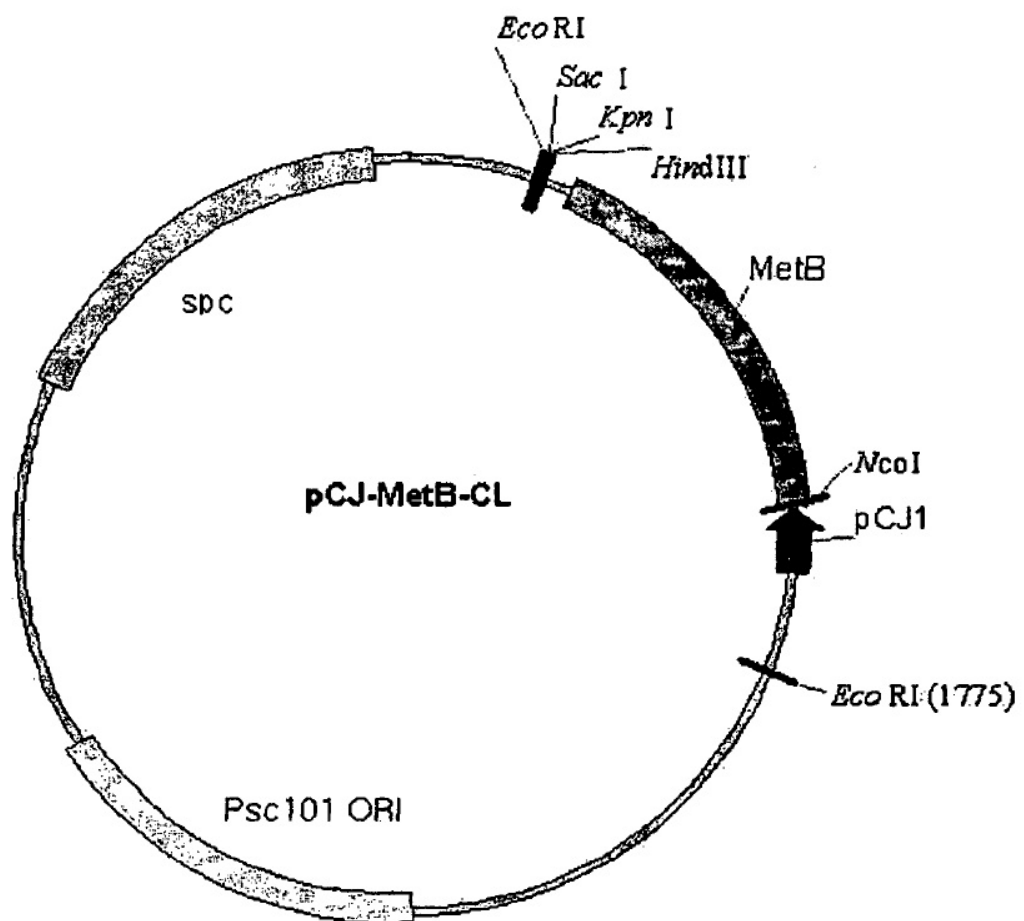
[Figura 2]



[Figura 3]



[Figura 4]



[Figura 5]

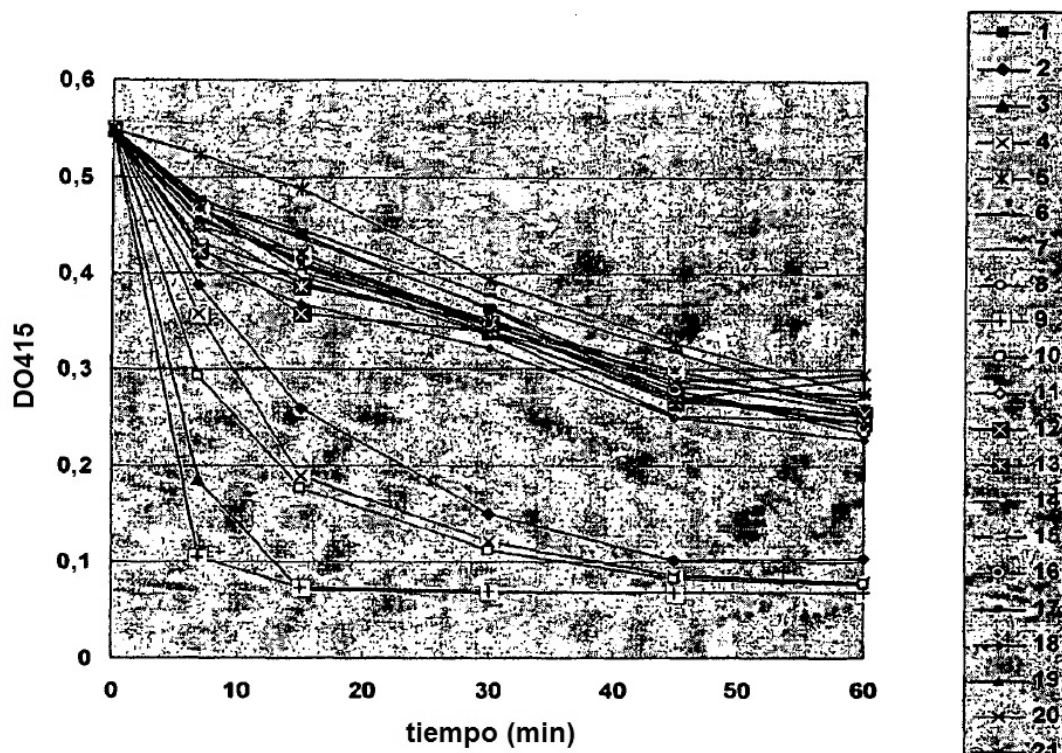


Figura. Síntesis de Met con OSHS

[Figura 6]

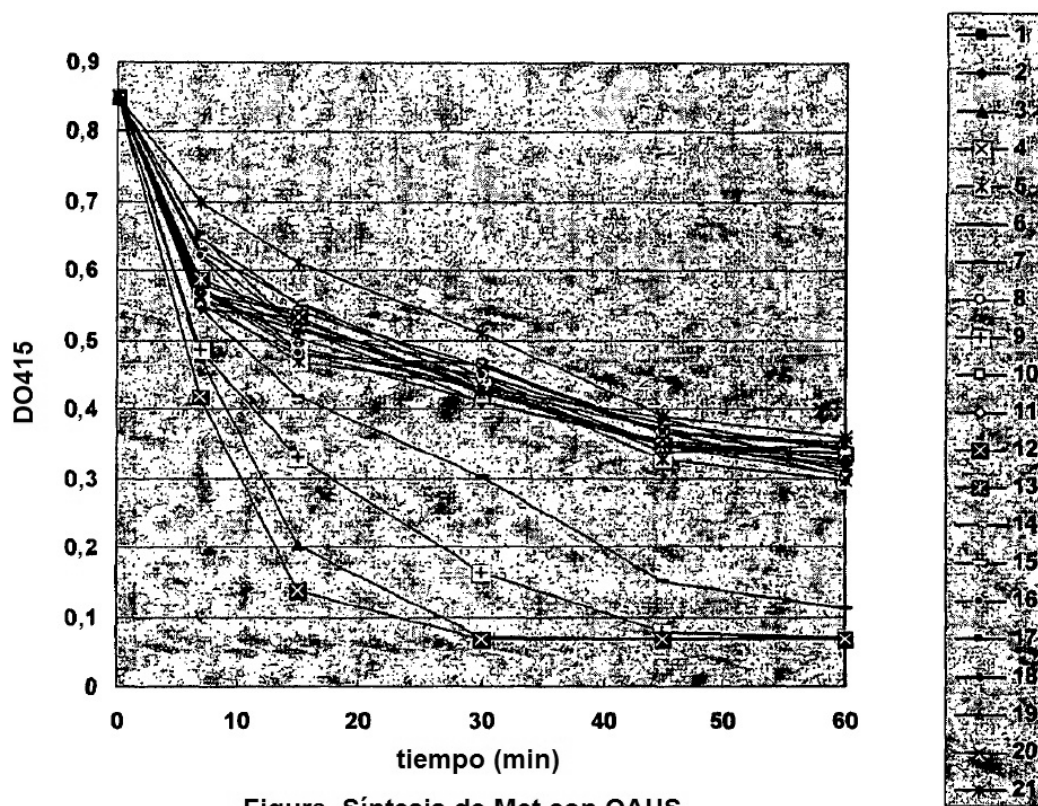
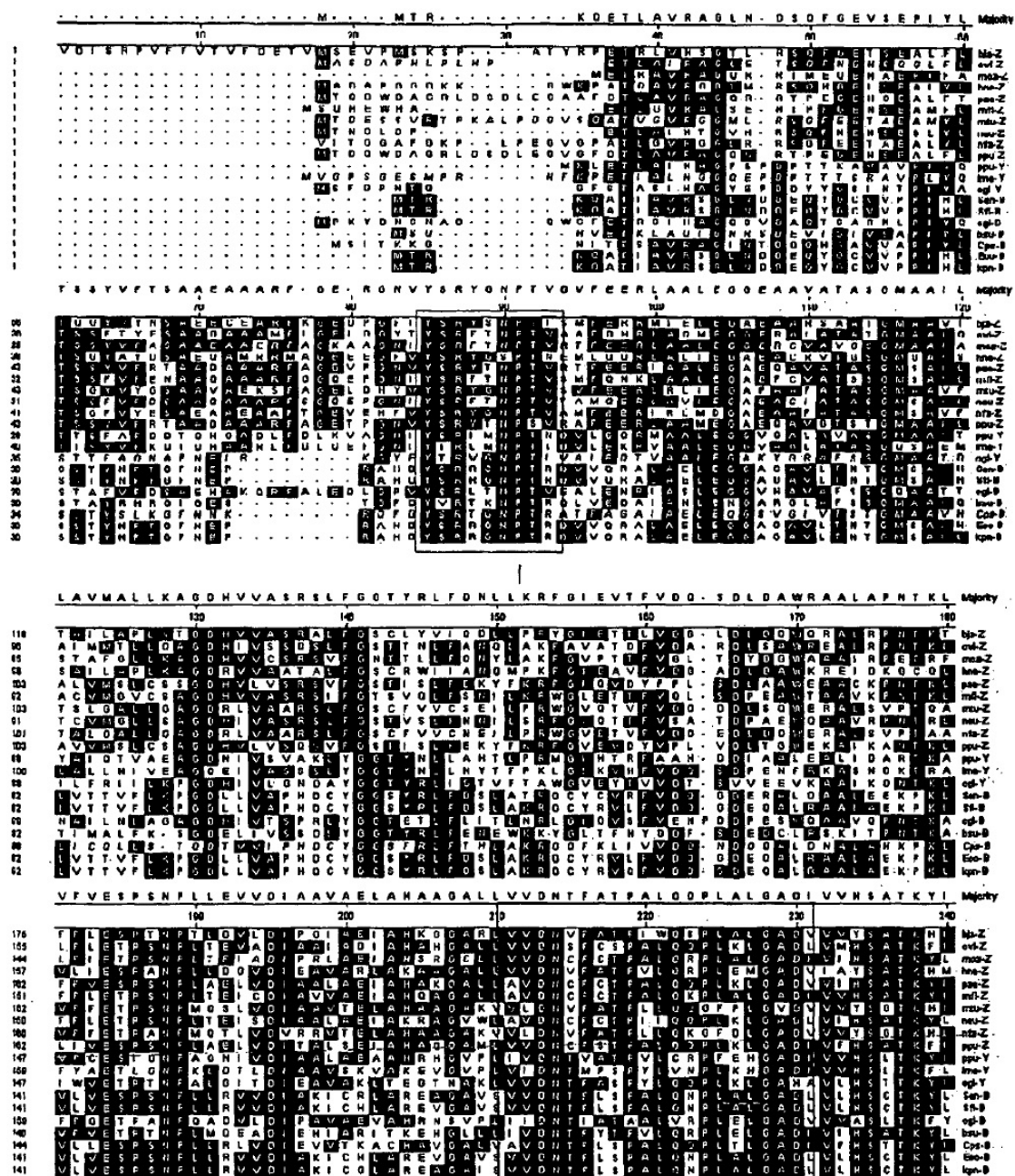


Figura. Síntesis de Met con OAHS



[Figura 8]

