

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 036**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12 (2006.01)

C12N 9/80 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2008 E 12198802 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2573189**

54 Título: **Aumento del rendimiento de la metionina**

30 Prioridad:

02.10.2007 WO PCT/EP2007/060433

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

06.02.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FIGGE, RAINER;
SOUCAILLE, PHILIPPE;
BARBIER, GUILLAUME;
BESTEL-CORRE, GWÉNAËLLE;
BOISART, CÉDRIC y
CHATEAU, MICHEL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 600 036 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

Aumento del rendimiento de la metionina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de metionina o sus derivados mediante el cultivo de un microorganismo en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y una fuente de azufre. El microorganismo y/o el medio de cultivo fueron modificados de tal manera que se produce un incremento en el rendimiento de metionina/fuente de carbono. También se reivindica el aislamiento de la metionina o de sus derivados del medio de fermentación.

Técnica anterior

Los compuestos que contienen azufre, tales como cisteína, homocisteína, metionina o S-adenosilmetionina resultan críticos para el metabolismo celular y son producidos industrialmente para ser utilizados como aditivos para la alimentación humana o animal, así como para productos farmacéuticos. Particularmente la metionina, un aminoácido esencial que no puede ser sintetizado por los animales, desempeña un papel importante en muchas de las funciones del organismo. Además de su rol en la biosíntesis de las proteínas, la metionina se encuentra involucrada en la transmetilación y en la biodisponibilidad del selenio y el cinc. La metionina también es utilizada de manera directa en el tratamiento de trastornos tales como la alergia y la fiebre reumática. Sin embargo, la mayor parte de la metionina producida es utilizada como aditivo para la alimentación animal.

La demanda de metionina en estado puro se ha visto incrementada por la disminución registrada en el uso de proteínas derivadas de los animales como consecuencia de la BSE y de la gripe aviar. Desde el punto de vista químico, la D,L-metionina generalmente se produce a partir de acroleína, metil mercaptano y cianuro de hidrógeno. Sin embargo, la mezcla racémica no se comporta tan bien como la L-metionina pura, como por ejemplo en los aditivos para la alimentación de pollos (Suanderson, C.L., (1985) *British Journal of Nutrition* 54, 621-633). La L-metionina pura se puede producir a partir de la metionina racémica, esto es, mediante el tratamiento con acilasa de la N-acetil-D,L-metionina, que aumenta los costes de producción de manera acentuada. La creciente demanda de L-metionina pura, junto con la preocupación por el cuidado del medio ambiente hace que la producción de metionina microbiana resulte interesante.

Los microorganismos han desarrollado mecanismos de regulación altamente complejos que efectúan un ajuste fino de la biosíntesis de los componentes celulares, permitiendo así las máximas tasas de crecimiento. En consecuencia, sólo se sintetizan las cantidades necesarias de metabolitos, tales como aminoácidos, que generalmente no pueden ser detectados en el sobrenadante de cultivo de cepas de tipo salvaje. Las bacterias controlan la biosíntesis de los aminoácidos principalmente por inhibición de la retroalimentación de las enzimas, y mediante la represión o activación de la transcripción de los genes. Los efectores de estas vías de regulación son, en muchos casos los productos finales de las vías relevantes. En consecuencia, las estrategias empleadas para lograr una sobreproducción de aminoácidos en los microorganismos requieren la desregulación de estos mecanismos de control.

La vía para la síntesis de la L-metionina en muchos microorganismos es bien conocida (figura 1). La metionina se obtiene del aminoácido aspartato, pero su síntesis requiere la convergencia de dos vías adicionales, la biosíntesis de la cisteína y el metabolismo de C1.

El aspartato es sintetizado a partir del oxaloacetato. En *E. coli*, se requiere una fuente estable de oxaloacetato para asegurar el funcionamiento adecuado del ciclo del ácido cítrico. Por lo tanto, la transformación de oxaloacetato en aspartato requiere unas reacciones que compensen el retiro de oxaloacetato de dicha fuente. Existen diversas vías llamadas reacciones anapleróticas, que cumplen estas funciones en *E. coli* (Sauer & Eikmanns (2005) *FEMS Microbiol Reviews* 29 p765-94). Bajo condiciones de crecimiento exponencial y de exceso de glucosa, la PEP carboxilasa cataliza la carboxilación de PEP, produciendo oxaloacetato. La eficacia de la carboxilación depende, entre otras condiciones, de la concentración intracelular de PEP. PEP es un metabolito central que pasa por un sinnúmero de reacciones. Una de ellas, la transformación glicólica de PEP en piruvato no es esencial para *E. coli*, ya que la importación de glucosa por vía del sistema PTS transforma una de las dos moléculas PEP generadas a partir de la glucosa en piruvato. En la glicólisis, la enzima piruvato cinasa que en *E. coli* está codificada por dos isoenzimas codificadas por los genes *pykA* y *pykF*, cataliza la transformación de PEP a piruvato.

El aspartato es convertido en homoserina mediante una secuencia de tres reacciones. La homoserina a continuación puede ingresar en la vía biosintética de la treonina/soleucina o de la metionina. En *E. coli*, el ingreso a la vía de la metionina requiere el acilado de la homoserina a succinil-homoserina. Esta etapa de activación permite la subsiguiente condensación con la cisteína, que conduce a la cistationina conteniendo tioéter, que es hidrolizada para proporcionar homocisteína. La transferencia final del metilo que conduce a la metionina se lleva a cabo a través de una metiltransferasa B₁₂-dependiente o B₁₂-independiente.

En *E. coli*, la biosíntesis de la metionina es regulada por la represión y activación de genes biosintéticos de metionina por vía de las proteínas MetJ y MetR, respectivamente (revisión realizada en Figge RM (2006), ed Wendisch VF, Microbiol Monogr (5) Amino acid biosynthesis p164–185. Es conocido que MetJ, conjuntamente con su correpresor S-adenosilmetionina, regula los genes *metA*, *metB*, *metC*, *metE* y *metF*. Otros genes que codifican enzimas que están involucradas en la producción de metionina, tales como *metH* y *metI* son activados por MetR en presencia de su coactivador homocisteína, mientras que *metA* sólo es activado por MetR en ausencia de homocisteína. Todas estas enzimas están relacionadas con la producción y la transferencia de unidades de C1 de serina a metionina. GlyA, que codifica la hidroximetiltransferasa serina, cataliza la conversión de serina a glicina y la concomitante transferencia de una unidad de C1 sobre la coenzima tetrahidrofolato (THF). La glicina puede entonces ser transformada en CO₂, NH₃, mientras que otra unidad de C1 es transferida a la THF. Esta reacción es catalizada por el complejo de escisión codificado por los genes *gcvTHP* y *lpd*.

Las unidades de C1 producidas por las dos reacciones en forma de metilén-THF pueden luego ser reducidas ya sea a metil-THF o nuevamente oxidadas a formil-THF. La biosíntesis de la metionina requiere la reducción a metil-THF. Así, la reacción de oxidación compite con la biosíntesis de la metionina por las unidades de C1. Se necesita formil-THF o formiato para la biosíntesis de las purinas y de la histidina. En *E. coli*, la formil-THF puede ser transformada en THF y formiato libre mediante una reacción catalizada por la formil-THF desformilasa codificada por el gen *purU* (Nagy et al. (1995) J. Bacteriol 177 (5) p. 1292–98).

La reducción de la metilén-THF a metil-THF es catalizada por la proteína MetF. La transferencia del grupo metil a la homocisteína es catalizada ya sea por MetH por la vitamina B12 o directamente por MetE. Es conocido que la enzima MetH presenta una tasa catalítica que es cien veces mayor que la enzima MetE. En ausencia de la vitamina B₁₂ y por lo tanto de MetH activo, Met E puede llegar a componer hasta un 5% de la proteína celular total. La presencia de MetH activo reduce la actividad de MetE probablemente al reducir la cantidad de homocisteína que normalmente activa la transcripción de *metE* vía MetR. Por lo tanto, la producción de metionina vía MetH ahorra importantes reservas para la célula, dado que MetE no está expresada en grandes cantidades. La acumulación de homocisteína resulta tóxica para *E. coli* (Tuite *et al.*, 2005 J. Bacteriol, 187, 13, 4362–4371.) y al mismo tiempo tiene un efecto negativo, regulatorio sobre la expresión *metA* vía MetR. Por lo tanto, resulta claro que se requiere una fuerte expresión de las enzimas MetH y/o Met E para que exista una producción eficiente de metionina.

En *E. coli* se integra azufre reducido a la cisteína y es transferido a continuación al precursor de la metionina o-succinil-homoserina, proceso denominado transulfuración (revisado en Neidhardt, F. C. (Ed. in Chief), R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, y H. E. Umbarger (eds). 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology). La cisteína es producida a partir de o-acetilserina y H₂S por sulfhidrilación. El proceso es regulado por retroalimentación negativa por el producto, cisteína, que actúa sobre la serina transacetilasa codificada por *cysE*. La N-acetil-serina, que se produce espontáneamente a partir de la o-acetil-serina, activa, junto con el factor de transcripción CysB, a los genes que codifican las enzimas responsables por el transporte de los compuestos de azufre, su reducción a H₂S y su integración en el compuesto organo-sulfuro cisteína, el que, como la metionina, es un aminoácido esencial.

En ausencia de cisteína, la MetB cataliza la conversión del precursor de la metionina o-succinil homoserina a amoníaco, γ -cetobutirato y succinato, reacción denominada γ -eliminación (Aitken & Kirsch, 2005, Arch Biochem Biophys 433, 166–75). El γ -cetobutirato puede luego ser convertido en isoleucina. Esta reacción secundaria no resulta deseable para la producción industrial de metionina, dado que los dos aminoácidos son difíciles de separar. Por ello, una baja actividad de γ -eliminación o cualquier otro modo de mantener baja la producción de isoleucina son aspectos importantes en la producción industrial de metionina. La solicitud de patente provisional US 60/650,124 describe como se puede reducir la γ -eliminación optimizando la enzima MetB. La optimización de la biosíntesis de la cisteína también puede reducir la γ -eliminación y, por tanto la consiguiente producción del subproducto isoleucina y constituye una forma de realización de la presente invención.

Además, el documento WO 2007/020295 describe las maneras teóricas de mejorar la biosíntesis de metionina en los microorganismos. Es realizado un análisis de modo de flujo comparando las redes metabólicas de los productores de aminoácidos tales como *C. glutamicum* y *E. coli*. En particular, el documento WO 2007/020295 indica que la disminución del flujo metabólico a través de la vía 'R79', es decir, la disminución de la reacción de degradación de formil-THF en formiato y tetrahidrofolato, podría resultar beneficiosa para la biosíntesis de metionina. Kromer et al., Metabolic Engineering, vol. 8, n° 4, 1 de julio de 2006, p. 353-369, de los mismos autores que el documento WO 2007/020295, describe un análisis teórico de las vías metabólicas implicadas en la producción de metionina, en *E. coli* y *C. glutamicum*.

El documento WO 99/27107 divulga unos estudios exhaustivos sobre la vía del formiato en microorganismos gram-positivos. En particular, los microorganismos presentan una expresión de las proteínas FTAP1/2 implicadas en el transporte del formiato, o por el contrario una inhibición de la actividad de estas proteínas. Alternativamente, los microorganismos presentan una inhibición de la actividad de la proteína PurU para producir productos mediante la fermentación de dichos microorganismos.

Nagy P L et al., Journal of Bacteriology, vol. 175, nº 21, 1993, p. 7066-7073, divulga un gen denominado *purU*, que codifica una proteína de 280 aminoácidos, implicada en la producción de formato.

Exposición general de la invención

5 La presente divulgación se refiere a un procedimiento para la producción de metionina, y sus derivados o precursores en un proceso de fermentación que comprende las siguientes etapas:

- 10 - cultivar un microorganismo modificado en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y una fuente de azufre, y
- recuperar la metionina del medio de cultivo,

15 en el que, comparado con un microorganismo o método no modificado, el microorganismo o el método ha sido modificado para que presente un rendimiento aumentado de la fuente de metionina/carbono, mediante al menos una de las siguientes modificaciones o combinaciones del mismo:

- 20 1- Una disminución en la desformilación del formil-THF en el microorganismo
- 2- Una disminución en el consumo de piruvato de fosfoenol (PEP) en el microorganismo.
- 3- Una limitación del crecimiento del microorganismo que se logra limitando la disponibilidad o privando al microorganismo de uno o varios sustratos inorgánicos en el medio de cultivo.

25 Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de metionina y su derivado N-acetil metionina en un proceso fermentativo según la reivindicación 1.

30 En la descripción de la presente invención, los genes y las proteínas se identifican utilizando las denominaciones de los genes correspondientes en *E. coli*. Sin embargo, y a no ser que se especifique lo contrario, el uso de estas denominaciones tiene un significado más general de acuerdo con la invención y comprende todos correspondientes los genes y proteínas en otros organismos y, más particularmente, microorganismos. También se pueden especificar los genes y las proteínas de otros organismos particularmente para *Corynebacterium glutamicum*, como información adicional. El fin de esta información adicional es no limitar la definición general de un gen o de una proteína.

35 En la presente invención se aumenta el rendimiento de la fuente de metionina/carbono disminuyendo la desformilación de la formil-THF, lo cual se logra eliminando la expresión del gen *purU* (YP_001137322 en *C. glutamicum*). La enzima PurU cataliza la reacción formil-THF desformilasa. La atenuación de la actividad de la desformilasa aumenta la producción de la metil-THF requerida para la metilación de la homocisteína. La pérdida de los metabolitos C1 por desformilación lleva a un aumento en la producción de homocisteína que no puede ser transformada en metionina. La homocisteína pueden entonces ser un sustrato para la enzima cistationina gama sintasa (MetB) que puede catalizar la reacción entre O-succinilhomoserina y homocisteína, lo que resulta en la producción de homolantionina.

45 En una forma de realización específica de la invención, el rendimiento de la fuente metionina/carbono se aumenta disminuyendo el consumo de piruvato de fosfoenol (PEP), lo que se logra mediante la eliminación de la menos uno o dos de los genes *pykA* y *pykF* que codifican la piruvato cinasa. El aumento en la disponibilidad de PEP aumenta la producción de oxaloacetato, un importante precursor del aspartato, que a su vez es un precursor de la metionina. *C. glutamicum* solo alberga un gen de la piruvato cinasa que corresponde a YP_226326.

50 En la presente invención, se aumenta asimismo el rendimiento de la fuente metionina/carbono limitando el crecimiento del microorganismo o privando al microorganismo de un sustrato inorgánico limitando la cantidad de fosfato y/o potasio disponible en el medio de cultivo. Esta limitación del crecimiento de la célula permite mejorar el rendimiento de la fuente de metionina/carbono, ya que el carbono no es utilizado para la producción de biomasa y/o el mantenimiento de dicha biomasa, sino para la producción de metionina. En particular, la concentración de fosfato en el medio de cultivo permite el crecimiento a una DO₆₀₀ de menos de 200, preferentemente de 150, más preferentemente de 100. Una DO₆₀₀ de 100 corresponde a 30 a 35 g/l de biomasa para *E. coli*, en el caso de levaduras de 40-50 g/l. El experto en la materia apreciará cuál es el factor de conversión para otros microorganismos. Para *E. coli*, la cantidad de fosfato requerida para producir un g de biomasa está entre 10 y 20 mg, preferentemente de aproximadamente 18 mg. La cantidad de potasio requerida para producir un g de biomasa está entre 10 y 20 mg, preferentemente de aproximadamente 18 mg.

El microorganismo se cultiva en un medio rico o mínimo, preferentemente en un medio mínimo. A continuación, se describen los medios mínimos adecuados.

65 Estos tres modos de modular el rendimiento de la fuente de metionina/carbono pueden ser utilizados solos o combinados con uno o dos de los otros medios.

Por lo tanto, la reducción de la desformilación de la formil-THF mediante la atenuación de la expresión del gen *purU* con una limitación en o privación de fosfato en el medio de cultivo puede estar asociada a una reducción del consumo de PEP mediante la atenuación de la expresión de los genes *pykA*, *pykF* o de ambos.

5 De manera similar, la reducción de la desformilación del formil-THF eliminando la expresión del gen *purU* con una limitación en o privación de fosfato en el medio de cultivo puede asociarse a una reducción del consumo de PEP atenuando la expresión de los genes *pykA*, *pykF* o ambos.

10 Tal como se utilizan en la presente memoria, los siguientes términos pueden ser utilizados para la interpretación de las reivindicaciones y la descripción.

15 De acuerdo con la invención, los términos "cultivo", "fermentación" o "proceso fermentativo" son utilizados en forma indistinta para referirse al crecimiento de bacterias en un medio de cultivo apropiado que contiene una simple fuente de carbono.

El rendimiento total de la fuente de metionina/carbono se define como la cantidad de metionina + NAM (por masa NAM de la cantidad equivalente de metionina) (g) %/ por glucosa (g) consumida durante el proceso de fermentación.

20 Los derivados de la metionina se originan a partir de las vías de transformación o degradación de la metionina. En particular, estos productos son la S-adenosil-metionina (SAM) tío-metilribosa y N-acetilmetionina (NAM). En especial, NAM es derivado fácilmente recuperable de la metionina que puede ser aislado y transformado en metionina por desacilación. La frase "recuperar metionina del medio del cultivo" designa la acción de recuperar metionina, SAM y NAM, así como todos los otros derivados que pudieran resultar útiles.

25 Se define a los precursores de la metionina como metabolitos que forman parte de la vía metabólica específica de la metionina o que pueden ser obtenidos de estos metabolitos. En particular, dichos precursores son la o-succinil-homoserina (OSH), la gamma-cistationina, la homocisteína y la homolantionina. La vía específica de la metionina comienza con la transformación de la homoserina a succinilhomoserina mediante la enzima homoserina succiniltransferasa (MetA).

30 El término "microorganismo" designa a una bacteria, levadura u hongo. Preferentemente, el microorganismo es seleccionado entre *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomyetaceae* y *Corynebacteriaceae*. Más preferentemente, el microorganismo es una especie de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Salmonella* o *Corynebacterium*. Aún más preferentemente, el microorganismo es de la especie *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum*.

35 El término "microorganismo modificado" se refiere a un microorganismo que ha sido modificado genéticamente con el objetivo de aumentar el rendimiento de la fuente metionina/carbono. El experto en la materia conoce cómo modular la expresión de genes específicos. Las modificaciones más usuales comprenden la transformación de los microorganismos con elementos genéticos, incluyendo reemplazo de genes, modificación de los promotores e introducción de factores para la expresión de genes heterólogos.

40 El término "rendimiento de fuente de metionina/carbono" define la cantidad de metionina obtenida durante la fermentación, dividida por la cantidad de la fuente de carbono que ha sido consumida. Puede expresarse en porcentaje g metionina/g fuente de carbono o mol metionina/ mol fuente de carbono. En este contexto, el término "resaltado" describe un aumento medible comparado con el microorganismo sin las modificaciones especificadas y/o el medio de cultivo sin las modificaciones. En las formas de realización preferidas, el aumento es de al menos 2% g/g, preferentemente de al menos 4% g/g, más preferentemente de al menos 7% g/g. El rendimiento total de la fuente metionina /carbono es preferentemente de al menos 7% g/g, preferentemente de al menos 12% g/g, preferentemente de al menos 15% g/g, más preferentemente de al menos 19% g/g.

45 A efectos de medir este aumento, se debe determinar la cantidad de glucosa consumida y metionina producida. La cantidad de la fuente de carbono que ha sido consumida se calcula determinando la concentración de la glucosa en el medio de cultivo por HPLC con detección refractométrica, o según el método de Brix para las soluciones de lotes alimentados. Para los cultivos de lotes, el consumo de glucosa corresponde a la cantidad de glucosa residual al principio del experimento, menos la cantidad de glucosa residual al final del experimento. En el caso de la fermentación de lotes alimentados (para una explicación con mayor detalle, ver ejemplos), la cantidad de glucosa consumida corresponde a la suma de glucosa en el cultivo de lotes alimentados, la glucosa añadida en el inóculo y la cantidad de glucosa inyectada durante la fase de lotes alimentados, de lo que se resta la cantidad de glucosa residual al final del experimento.

50 El término "metionina obtenida" incluye la L-metionina y el derivado NAM de la metionina fácilmente recuperable. La cantidad de metionina obtenida en el medio se mide por HPLC luego de la detección OPA/Fmoc de los derivados por fluorometría, utilizando como estándar L-metionina (Fluka, Ref 64319). La cantidad de NAM se determina utilizando HPLC refractométrica utilizando como estándar NAM (Sigma, Ref 01310).

El término ‘fuente de carbono’ según la presente invención se refiere a cualquier fuente de carbono que pueda ser utilizada por los expertos en la materia como soporte para el crecimiento normal de un microorganismo, y que pueden ser hexosas (tales como glucosa, galactosa o lactosa), pentosas, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos (tales como sacarosa, celobiosa o maltosa), melazas, almidón o sus derivados, hemicelulosas, glicerol y sus combinaciones. Una de las fuentes de carbono simple especialmente preferido es la glucosa. Otra fuente de carbono simple preferida es la sacarosa.

De acuerdo con la invención, el término ‘atenuación de la expresión de un gen denota la supresión parcial o completa de la expresión de un gen, que entonces se dice está ‘atenuado’. Esta supresión de la expresión puede ser ya sea la inhibición de la expresión del gen, una eliminación de toda o parte de la región del promotor necesaria para la expresión del gen, una eliminación en la región de codificación del gen, o el cambio de un promotor de tipo salvaje por un promotor natural más débil o sintético. Preferentemente, la atenuación de un gen consiste, esencialmente, en la eliminación completa de dicho gen, que puede ser reemplazado por un gen marcador de selección que facilita la identificación, el aislamiento y la purificación de las cepas según la invención. El gen es inactivado preferentemente mediante la técnica de recombinación homóloga Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) “One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640–6645).

En este contexto, los términos “mejorado” o “sobrexpresado” describen el aumento en la actividad intracelular de una actividad enzimática que está codificada por el ADN correspondiente, como por ejemplo, aumentando el número de copias del gen, utilizando un promotor más fuerte o un alelo con actividad aumentada y, posiblemente, combinando estas medidas.

Los términos “expresión aumentada”, “expresión mejorada” o “sobrexpresión” se utilizan en forma indistinta en el presente texto y tienen un significado similar.

A efectos de aumentar la expresión de un gen, éste puede ser codificado de forma cromosómica o extracromosómica. Cuando se hace de forma cromosómica, existen una o varias copias del genoma que pueden ser introducidas utilizando métodos de recombinación conocidos por el experto en la materia. En forma extracromosómica, los genes pueden ser transportados por diferentes tipos de plásmidos que difieren respecto a su origen de replicación y, por lo tanto en el número de copias en la célula. Pueden estar presentes con 1–5 copias, o con 20 y hasta 500 copias, y corresponder a plásmidos con un bajo número de copias con una replicación ajustada (pSC101, RK2), plásmidos con un bajo número de copias pACYC, pRSF1010) o un alto número de copias (pSK bluescript II).

En una forma de realización preferida de la invención, el gen puede ser expresado utilizando promotores de diferente fuerza, la cual puede ser inducida. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos. El experto en la materia conoce cuáles son los promotores más convenientes: los promotores más comúnmente utilizados son, por ejemplo, *P_{trc}*, *P_{tac}*, *P_{lac}* o el promotor lambda *cl*.

Se puede estimular o reducir la expresión de las enzimas por elementos que estabilicen o desestabilicen al mensajero ARN (Carrier y Keasling (1998) Biotechnol. Prog. 15, 58–64) o a las proteínas correspondientes (e.g. GST tags, Amersham Biosciences).

La presente divulgación se refiere asimismo a microorganismos que contienen uno o varios alelos del gen que debe ser aumentado según la invención. Más específicamente, la presente invención se refiere a microorganismos que comprenden las modificaciones definidas en las reivindicaciones 12 y 13.

En la descripción de la presente invención, los genes y las proteínas han sido identificadas utilizando las denominaciones de los genes correspondientes en *E. coli*. Sin embargo, y a no ser que se especifique lo contrario, el uso de estas denominaciones según la invención tiene un significado más generalizado y comprende todos los correspondientes genes y proteínas en otros organismos y, más particularmente, microorganismos.

La PFAM (protein families database of alignments and hidden Markov models; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) representa una extensa colección de alineaciones de secuencia de proteínas. Cada PFAM hace posible visualizar múltiples alineaciones, ver los dominios de las proteínas, evaluar su distribución entre organismos diferentes, tener acceso a otras bases de datos y visualizar estructuras proteicas conocidas.

Los COGs (clusters of orthologous groups of proteins); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/> se obtienen comparando las secuencias de proteínas de 66 genomas cuya secuencia ya ha sido completada y que representan las 30 principales líneas filogénicas. Cada COG se define a partir de por lo menos tres líneas, lo que permite la identificación de los dominios conservados con anterioridad.

Los medios para identificar las secuencias homólogas y sus porcentajes de homología son bien conocidos por los expertos en la materia, e incluyen, en particular, los programas BLAST, que pueden ser utilizados ingresando al sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> utilizando los parámetros por defecto que se indican en dicho sitio web. Las

secuencias obtenidas luego pueden ser explotadas (esto es, alineadas) utilizando, por ejemplo los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) o MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), utilizando los parámetros por defecto indicados en dichos sitios web.

5 Utilizando las referencias suministradas en el GenBank para genes conocidos, los expertos en la materia pueden determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo de rutina se realiza ventajosamente utilizando secuencias consensuadas que pueden determinarse llevando a cabo alineaciones de secuencia con genes derivados de otros microorganismos y diseñando sondas degeneradas para clonar el gen correspondiente en otro organismo. Estos métodos de rutina empleados en biología molecular son bien conocidos por los expertos en la materia, y han sido reivindicados, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

10 “Someter un organismo a una limitación de un sustrato inorgánico” define el estado bajo el cual el crecimiento de los microorganismos está gobernado por la cantidad de una sustancia química no orgánica suministrada, la que aún permite un crecimiento débil. Algunos ejemplos de estos sustratos son: fosfato, potasio, magnesio o una combinación de éstos.

15 Privar a un microorganismo de un sustrato inorgánico define el estado por la cual el crecimiento de un microorganismo se detiene por completo debido a la ausencia del sustrato inorgánico. Algunos ejemplos de dichos sustratos son: fosfato, potasio, magnesio o una combinación de éstos.

20 En la presente invención, el objetivo de los inventores consiste en aumentar el rendimiento de la fuente de metionina/carbono mediante ingeniería metabólica aplicada a la cepa de producción. En una forma de realización particular de la invención, el rendimiento de metionina/ glucosa y/o metionina/sucrosa (g/g) es de al menos 10% (g/g), preferentemente de la menos 15% (g/g), más preferentemente de 19% (g/g).

25 En una forma de realización específica de la invención, se aumenta la expresión de por lo menos uno de los genes involucrados en la asimilación del azufre, de la producción de serina, de su transformación a glicina o en el clivaje de la glicina. Resulta ventajoso aumentar la asimilación de azufre del microorganismo dado que la metionina es un aminoácido que contiene azufre (C₅H₁₁NO₂S). Además, resulta ventajoso aumentar la producción de los aminoácidos serina y glicina y el clivaje (esto es, el catabolismo) de la glicina. El clivaje de la glicina y la transformación de serina a glicina son dos de las principales reacciones que producen metilén-THF, que puede ser reducido a metil-THF, el que a su vez se requiere para la metilación de la homocisteína a metionina. La producción de serina es catalizada por las enzimas 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, fosfoserina fosfatasa y fosfoserina aminotransferasa. La escisión de la glicina es catalizada por el complejo de escisión de la glicina.

30 En *E. coli* y *Corynebacterium glutamicum*, las enzimas cuya actividad puede ser aumentada y que están involucradas en las acciones descritas anteriormente, están codificadas por los siguientes genes (seguidos por el número de acceso y función del polipéptido correspondiente):

gen	número de acceso	función
	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i> (<i>jekeium</i> indicado en paréntesis)
cysA	1788761	Cgl0216 sulfato permeasa
cysU, cysT	1788764	Cgl0213 componente del transportador de sulfato ABC
cysW	1788762	proteína de transporte de sulfato de unión a membrana
cysH	1789121	Cgl2816 adenililsulfato reductasa
cysI	1789122	Cgl2817 sulfito reductasa, subunidad alfa
cysJ	1789123	YP_22705 sulfito reductasa, subunidad beta
cysK	1788754	Cgl2562 cisteína sintasa
cysM	2367138	Cgl2136 O-acetil serina sulfidrilasa
cysP	1788765	proteína de enlace de sulfato periplasmática
cysE	1790035	Cgl2563 Serina acetiltransferasa
gcvT	1789272	(YP_249980) Aminometil transferasa dependiente del tetrahidrofolato
gcvH	1789271	(YP_249981) Transportador del grupo aminometil, escisión de la glicina
gcvP	1789269	(YP_249979) Glicina deshidrogenasa (descarboxilación)
lpd	1786307	YP_224666 Lipoamida deshidrogenasa
serA	1789279	YP_225572 Fosfoglicerato deshidrogenasa
serB	1790849	YP_226764 fosfoserina fosfatasa
serC	1787136	YP_225120 Fosfoserina aminotransferasa
glyA	1788902	NP_60022 Serina hidroximetiltransferasa

45 En una forma de realización específica de la invención, está aumentada la expresión de los operones *cysPUWAM*, que codifican el importador de sulfato/tiosulfato y la cisteína sintasa específica del tiosulfato, y/o el operón *cysJIH* que codifica a la sulfito reductasa y PAPS reductasa. En el caso de la *Corynebacterium* *cysA*, *cysT*, *cyl* y *cysJ* son preferentemente aumentados en la expresión.

5 En otra forma de realización específica de la invención se ha aumentado la expresión del operón *gcvTHP*, y/o del gen *lpd* que codifica el complejo de escisión de la glicina. Se puede introducir y sobreexpresar el complejo de escisión de la glicina en *Corynebacterium glutamicum* introduciendo los genes *gcvTHP* de *Corynebacterium jeikeium* posiblemente como un gen sintético.

En otra forma de realización específica de la invención, se encuentra sobreexpresado al menos uno de los genes involucrados en la producción de glicina, tales como *serA*, *serB*, *serC* o *glyA*,

10 En otra forma de realización de la invención, se pueden sobreexpresar las enzimas involucradas en la vía metabólica de la biosíntesis de la metionina o aumentar su actividad, para estimular la producción de metionina. En particular, puede haber sobreexpresión en por lo menos uno de los siguientes genes que codifican dichas enzimas:

- 15 - *metF* 1790377 Cgl2171 5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa
- los alelos *metA* (1790443) que codifican las homoserina succiniltransferasas con reducción de la sensibilidad de retroalimentación a S-adenosilmetionina y/o metionina, tal como se describe en el documento WO 2005/10856 o, en el caso de *Corynebacterium glutamicum*, el gen *metX* Cgl0652
- 20 - los alelos *thrA* o *thrA* (1786183) que codifican las aspartocinasas/homoserina deshidrogenasas con inhibición de retroalimentación reducida a la treonina
- En el caso de *Corynebacterium glutamicum asp* y *hom*, potencialmente resistentes a la retroalimentación tal como se describe en el documento WO 2007/012078, pueden estar sobreexpresados
- 25 - *metH* 1790450 Cgl1507 homocisteína B12-dependiente N5-metiltetrahidrofolato transmetilasa
- *CysE* 1790035 Cgl2563 serina acetiltransferasa

30 Se puede contemplar la sobreexpresión de *metY* (Cgl0653) en *C. glutamicum* con o sin sobreexpresión de los genes *aecD/metB*. (Cgl2309/Cgl2446).

35 En los documentos WO 2007/077041 y WO2007/012078 se ha sugerido la sobreexpresión de *metF* y *metH*. En este documento, los inventores demostraron que una sobreexpresión aún mayor de *metF* utilizando elementos que estabilicen al mensajero ARN de *metF* produjo un mayor aumento en la producción de metionina. Estos elementos estabilizadores generalmente son estructuras en bucle que reducen el ataque por parte de las nucleasas degradadoras del ARN (Carrier y Keasling (1998) Biotechnol. Prog. 15, 58-64).

40 En la solicitud de patente WO 2005/111202, se describen los alelos que sobreexpresan la homoserina succiniltransferasa, con una sensibilidad de retroalimentación reducida a sus inhibidores SAM y metionina.

La sobreexpresión de *cysE* ha sido sugerida en el documento WO 2007/077041.

45 La producción de metionina puede ser aumentada aún más utilizando un alelo alterado *metB* que usa preferente o exclusivamente H₂S produciendo, de este modo, homocisteína de la O-succinil-homoserina, tal como se describió en la solicitud de patente WO 2004/076659.

50 Se puede lograr un adicional aumento en la producción de L-metionina en *E.coli*, sus precursores o derivados, atenuando o suprimiendo el gen para la proteína represora MetJ (GenBank 1790373), responsable del descenso regulado del regulón de la metionina, tal como se sugirió en la solicitud de patente JP 2000/157267. En *Corynebacterium*, el regulador maestro del azufre McbR (AAP45010) debe ser eliminado, tal como se indica en el documento WO2007/012078.

55 En otra forma de realización específica de la invención, se reduce la producción del subproducto isoleucina. La isoleucina es un aminoácido que sólo puede ser separado de la metionina con gran dificultad, aumentando drásticamente el coste de producción de la metionina pura. Además, la producción de isoleucina consume carbono que podría ser utilizado para la producción de metionina. Por lo tanto, resulta deseable que la producción de isoleucina se mantenga lo más baja posible.

60 La isoleucina se produce ya sea por vía de la síntesis de la treonina o por vía de la reacción de γ -eliminación de la O-succinilhomoserina, en ausencia de cisteína.

Los medios para reducir la actividad de la γ -eliminación han sido descritos en las solicitudes de patente WO 2006/082254 y WO 2007/077041.

65 La producción de isoleucina se sitúa por debajo del límite de detección (HPLC) en un microorganismo no modificado

tal como *E. coli*. En el microorganismo modificado, la cantidad producida puede alcanzar 2 % g isoleucina/g glucosa. La cantidad de isoleucina recuperada del medio puede ser mayor que 40 mM.

5 Los inventores han demostrado que la sobreexpresión de por lo menos uno de los siguientes genes involucrados en la biosíntesis de la serina también reduce la producción de isoleucina.

gen	número de acceso		función
	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	
serA	1789279	YP_22557	fosfoglicerato deshidrogenasa
serB	1790849	YP_226764	fosfoserina fosfatasa
serC	1787136	YP_225120	fosfoserina aminotransferasa

En una forma de realización más específica de la invención, los inventores han demostrado que un aumento en la expresión de *serA*, *serB* y/o *serC* reduce la producción del producto secundario isoleucina.

10 En otra forma de realización específica de la invención, se reduce la producción secundaria de la homolantionina. La homolantionina es un aminoácido producido a partir de homoserina y homocisteína activadas (Kromer et al (2006) J Bacteriol 188, 609–18; y solicitud de patente WO 2007/051725 por BASF). La homolantionina es un aminoácido que puede ser separado de la metionina sólo con gran dificultad, lo cual incrementa drásticamente el coste de la producción de la metionina pura. Además, la homolantionina comprende dos moléculas de homoserina derivadas del aspartato y una molécula reducida de sulfuro; de transformarse en metionina, todo esto incrementaría el rendimiento metionina/fuente de carbono. Por lo tanto es deseable que la producción de homolantionina sea mantenida tan baja como sea posible y que los precursores sean transformados en metionina. La solicitud de patente PCT WO 2007/051725 propone algunas vías para reducir la producción de homolantionina. Los inventores han descubierto otros medios para reducir la producción de homolantionina que, al mismo tiempo, permiten la transformación del sustrato homocisteína en metionina. Los procedimientos específicos que favorecen la transformación de la homocisteína en metionina son la atenuación de la actividad de la formil–THF desformilasa codificada por el gen *purU*, la sobreexpresión de la actividad de la metilén–THF reductasa codificada por el gen *metF*, la atenuación de la sobreexpresión del gen *pykA* y/o *pykF*, la sobreexpresión de *serA*, *serB* o *serC* o la sobreexpresión del gen *lpd*.

La fuente de azufre usada para la producción fermentativa de la L–metionina, sus precursores o compuestos derivados de los mismos puede ser, ya sea, sulfato, tiosulfato, sulfuro de hidrógeno, ditionato, ditionito, sulfito o una combinación de los mismos.

30 En una forma de realización preferida de la invención, la fuente de azufre es sulfato y/o tiosulfato.

Como fuente preferida de carbono, los inventores recomiendan glucosa o sacarosa.

35 La invención también se refiere al proceso para la producción de L–metionina y su derivado N-acetil metionina, que comprende la fermentación de los microorganismos descritos anteriormente, la concentración de la metionina, sus precursores o derivados y la aislación de/los producto(s) deseado(s) del caldo de fermentación.

40 Los expertos en la materia pueden definir las condiciones de cultivo para los microorganismos de acuerdo a la invención. En particular, las bacterias son fermentadas a una temperatura entre 20°C y 55°C, preferent emente entre 25°C y 40°C, y más específicamente aproximadamente 30°C para *C. glutamicum* y alrededor de 37°C para *E. coli*.

45 La fermentación se lleva a cabo generalmente en fermentadores con un medio de cultivo inorgánico de composición conocida y definida, adaptada a la bacteria usada, que contiene por lo menos a una fuente sencilla de carbono, y si es necesario un cosustrato necesario para la producción del metabolito.

En particular, el medio de cultivo inorgánico para *E. coli* puede tener una composición idéntica o similar al medio M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120–128), al medio M63 (Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) o un medio tal como el definido por Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270: 88–96).

55 Análogamente, el medio de cultivo inorgánico para *C. glutamicum* puede ser de composición idéntica o similar al medio BMCG (Liebl *et al.*, 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205–210) o a un medio tal como el que describen Riedel *et al.* (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573–583). El medio puede ser suplementado para compensar auxotrofias introducidas por mutaciones.

60 Tras la fermentación de la L–metionina, de ser necesario, sus precursores o las combinaciones resultantes, es/son recuperados y purificados. Los métodos utilizados para la recuperación y purificación de los compuestos producidos, tales como la metionina y N–acetil–metionina, del medio de cultivo son bien conocidos por los expertos en la materia.

Opcionalmente, de 0 a 100%, preferentemente al menos 90%, y más preferentemente 95%, y aun más preferentemente por lo menos el 99% de la biomasa puede ser retenida durante el proceso de purificación del producto de la fermentación.

5 Opcionalmente, el derivado de la metionina N-acetil-metionina es transformado en metionina por desacilación, antes de la recuperación de la metionina.

10 La invención se refiere asimismo a un microorganismo que es optimizado para la producción fermentativa de la metionina, esto es, que tiene un rendimiento mejorado de metionina/fuente de carbono comparado con un microorganismo no modificado, y que comprende todas las modificaciones descritas anteriormente.

Dibujos:

15 Figura 1

Biosíntesis de metionina en *E. coli*. Abreviaturas: P fosfato, GA3P gliceraldehído-3-fosfato, PGA fosfoglicerato, PEP fosfoenolpiruvato, Pyr piruvato, Asp aspartato, Asp-P aspartilfosfato, Asp-SA aspartato semialdehído, homoser homoserina, OSH o-succinilhomoserina, γ -cys γ -cistationina, homocys homocisteína, homolan homolantionina, THF tetrahidrofolato, Ser serina, Cyst Cisteína, Gly glicina, PPP lanzadera de pentosafosfato.

Figura 2:

25 Evolución de $DO_{600\text{ nm}}$ y $Y_{\text{met}^+ \text{ NAM}}$ para la cepa1 *P_{trc}-cysPUWAM P_{trc}-cysJIH Δ pykF Δ pykA P_{trc}09-gcvTHP* cultivada bajo tres condiciones de cultivo diferentes: cultivo con exceso de fosfato (símbolos en color sólido), cultivada con privación de fosfato 100 $UDO_{600\text{ nm}}$ (símbolos en blanco) y cultivada con limitación de fosfato (símbolos en gris).

Descripción detallada de la invención

30 En el documento PCT WO2005108561, presentado el 12 de mayo, 2004 se ha descrito una cepa de *E. coli* en la cual el represor de la metionina codificada por el gen *metJ* ha sido reemplazada por un casete para cloranfenicol (Δ *metJ::Cm*) y que anida un alelo *metA* con sensibilidad de retroalimentación reducida a la metionina y al SAM (*metA*11*). La sobreexpresión de los genes *metF* y *metH* de promotores integrados hacia 5' de los genes estructurales dentro del cromosoma (*P_{trc}-metF*, *P_{trc}-metH*), ha sido descrita en la solicitud de patente WO 2007/077041. Este documento también describe la sobreexpresión de una aspartocinasa/homoserina deshidrogenasa con una inhibición de retroalimentación reducida a la treonina (*thrA**) y una sobreexpresión de la serina acetil-transferasa (*cysE*) y el *metA*11* de el plásmido pME101. Una cepa con todas las modificaciones descritas en las solicitudes de patentes mencionadas anteriormente, denominada cepa1 en la presente solicitud, tiene el genotipo Δ *metJ metA*11 P_{trc}-metH P_{trc}-metF* (pME101-*thrA*1-cysE-PgapA-metA*11*). Todas las construcciones siguientes descritas a continuación están basadas en estas construcciones.

Construcción de cepas que sobreexpresan los operones *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP* y los genes *metF*, *serA*, *serC*, *serB*, *glyA* y *lpd*, y las cepas con supresiones de los genes *pykA*, *pykF* y *purU*

45 Todas las construcciones, con la excepción de la *metF*, fueron inicialmente preparadas en la cepa *E. coli* MG1655 y subsecuentemente transferidas por transducción dentro de la cepa final

Construcción de MG1655 *P_{trc}-cysPUWAM*

50 Para poner el operón *cysPUWAM* bajo el control del promotor heterólogo *P_{trc}*, se utilizó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia al cloranfenicol o a la kanamicina junto con el promotor heterólogo hacia 5' de los genes considerados. Con esta finalidad se usaron los siguientes oligonucleótidos:

55 *P_{trc}-cysPUWAM* F (SEC ID N° 1)

GCGCGAGTGAGTTCTTTTTCAGTAAGTTAACGGCCATTGCGCACCCCTTATAAATTTAATGACTTTCTTCCACACAT
TATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACAGCTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

60 con

– una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (2541512–2541578) del gen *cysP* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),

65 – una región (mayúscula, negrita) para la amplificación del casete de resistencia al cloranfenicol (secuencia de

referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

- una región (mayúscula, cursiva) para la secuencia del promotor *trc* con la caja –35 y –10 subrayada.

5 P_{trc}–cysPUWAM R (SEC ID N° 2)

CCAAATCACCAAACGGTATATAAAACCGTTACTCCTTTACGTCGGTTATAAATATGATGGCTATTATCACACTGG
CTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCCATATGAATATCCTCCTTAG

10 con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (2541644–2541578) de la región hacia 5' del gen *cysP* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),

- 15
- una región (mayúscula, en negrita) para la amplificación del casete de resistencia al cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

- una región (mayúscula, cursiva, subrayada) para la secuencia del terminador del bacteriófago T7 (Genbank V01146)

20 Los oligonucleótidos P_{trc}–cysPUWAM F y P_{trc}–cysPUWAM R fueron usados para amplificar el casete de resistencia al cloranfenicol del plásmido pKD3. El producto obtenido de la PCR se introdujo entonces en la cepa MG1655 (pKD46) por electroporación. En esta cepa la enzima Red recombinasa se expresó y permitió la recombinación homóloga. Se seleccionaron entonces los transformados resistentes al cloranfenicol y se verificó la inserción del casete de resistencia por análisis PCR con los oligonucleótidos P_{trc}–cysPUWAMRv y P_{trc}–cysPUWAMFv que se muestran a continuación. La cepa retenida se denominó MG1655 *P_{trc}–cysPUWAM: Cm*.

25 P_{trc}–cysPUWAMRv (SEC ID N° 3): GCAGGATTTGTACGTCGGTCACC (homóloga a la secuencia de 2541260 a 2541282).

30 P_{trc}–cysPUWAMFv (SEC ID N° 4): cgtctgaactaagtcaccagc (homóloga a la secuencia de 2541812 a 2541789).

Construcción de MG1655 P_{trc}–cysJIH

35 Para poner el operón *cysJIH* bajo el control del promotor heterólogo *P_{trc}*, se utilizó la estrategia recombinante homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia al cloranfenicol o un casete de resistencia a la kanamicina junto con un promotor heterólogo hacia 5' de los genes considerados. Con esta finalidad se usaron los siguientes oligonucleótidos:

40 P_{trcF}–cysJIH R (SEC ID N° 5)

CCAGTAAGCAAAGCTGTTTCTGCGCCCTGTACGCGCCATAAAACAGAAGAGATTCCACACATTATACGAGCCG
GATGATTAATTGTCAACAGCTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

45 con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (2889935 – 2889987) del gen *cysJ* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),

- 50
- una región (mayúscula, en negrita) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

- una región (mayúscula, en cursiva) para la secuencia del promotor *trc* con la caja –35 y –10 subrayada.

55 P_{trcF}–cysJIH F (SEC ID N° 6)

GGTTATTAGTTATCGCTATCCCCTCTTTAATCCACACCGTTTGCCCCGTTAACCTTACCTTCACACTGGCTCACCT
TCGGGTGGGCCTTTCTGCCATATGAATATCCTCCTTAG

60 con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (2890047 – 2889988) de la región hacia 5' del gen *cysJ* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),

- 65
- una región (mayúscula, en negrita) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

- una región (mayúscula, en itálica, subrayada) para secuencia terminal del bacteriófago T7 (Genbank V01146)

Los oligonucleótidos *P_{trc}F-cysJ_{IH} F* y *P_{trc}F-cysJ_{IH} R* fueron utilizados para amplificar el casete de resistencia a la kanamicina del plásmido pKD4. El producto obtenido por PCR fue entonces introducido en la cepa MG1655 (pKD46) por electroporación. En esta cepa se expresó la enzima Red recombinasa, permitiendo la recombinación homóloga. Los transformados resistentes a la kanamicina fueron seleccionados y se verificó la inserción del casete de resistencia por análisis PCR con los oligonucleótidos *P_{trc}-cysJ_{IHFv}* y *P_{trc}-cysJ_{IHRv}* que se muestran a continuación. La cepa retenida se denominó MG1655 *P_{trc}-cysJ_{IH}:Km*.

P_{trc}-cysJ_{IHFv} (SEC ID N° 7): GCAGTTCGACAAGTTCTTTACC (homóloga a la secuencia de 2889042 a 2889064).

P_{trc}-cysJ_{IHRv} (SEC ID N° 8): CCAGAACACAACACCCTAACATAGCG (homóloga a la secuencia de 2890663 a 2890638).

Construcción del MG1655 *P_{trc}09-gcvTHP*

Para poner el operón *gcvTHP* bajo el control del promotor heterólogo *P_{trc}*, se utilizó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia al cloranfenicol o un casete de resistencia a la kanamicina junto con el promotor heterólogo hacia 5' de los genes considerados. Con esta finalidad se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

P_{trc}-gcvTHP F (SEC ID N° 9)

CCACCATGCGAGCGCCGCAAAGCGTGTGTTGTTTCGTACAAAGGAGTCTGTTGTGCCATAATATAC**CCTCCTTATTC**
CACAC**ATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACAGCTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG**

con

- una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia (3048630 – 3048687) del gen *gcvT* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (mayúscula, negrita) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),
- una región (mayúsculas, cursiva) para la secuencia del promotor con la caja –35 y –10, subrayada

P_{trc}-gcvTHP R (SEC ID N° 10)

CTGTCGCGATTTTTGCATTTTTTAACCATAAGCTAATGTGATGATCAATTTTACCTTACATATGAATAT**CCTCCTTA**
G

con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (3048887 – 3048830) de la región hacia 5' del gen *gcvT* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (mayúscula, negrita) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

Los oligonucleótidos *P_{trc}-gcvTHP F* y *P_{trc}-gcvTHP R* fueron utilizados para amplificar el casete de resistencia a la kanamicina obtenido del plásmido pKD4. El producto obtenido por PCR fue entonces introducido por electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). En esta cepa, se expresó la enzima Red recombinasa, permitiendo la recombinación homóloga. Los transformados resistentes a la kanamicina fueron seleccionados y se verificó la inserción del casete de resistencia por análisis PCR con los oligonucleótidos *P_{trc}-gcvTHP F2* y *P_{trc}-gcvTHP R2* que se muestran a continuación. La cepa retenida fue denominada MG1655 *P_{trc}-gcvTHP Km*.

P_{trc}-gcvTHP F2 (SEC ID N° 11): CTATCACACCGCCAGAGGCATTC (homóloga a la secuencia de 3048399 a 3048421).

P_{trc}-gcvTHP R2 (SEC ID N° 12): CCCATCACACTTTCATCTCCCG (homóloga a la secuencia de 3049106 a 3049085).

Construcción de MG1655 Δ pykA

Para eliminar el gen *pykA*, se utilizó la estrategia de homologación recombinante descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia al cloranfenicol o un casete de resistencia a la kanamicina dentro de los genes en consideración. Con esta finalidad se usaron los siguientes oligonucleótidos:

DpykA F (SEC ID N° 13)

cgcgggcgggtgccaacgttgtagctatgaactttctcacggctcgctgaagatcacaaaaatgcgcgcgataaagttcg**TGTAGGCTGGAGCTGCTT**
CG

con

- una región (minúscula) homóloga a la secuencia (1935756 – 1935838) de la región *pykA* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (mayúscula, negrita) para la amplificación del casete de resistencia al cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

DpykA R (SEC ID N° 14)

CGCCGCATCCGGCAACGTACTIONACTACTCTACCGTTAAAATACGCGTGGTATTAGTAGAACCCACGGTACTCATCAC
GTCGCCCC**CATATGAATATCCTCCTTAG**

con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (1937135 – 1937055) de la región *pykA* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>).
- una región (mayúscula, negrita) para la amplificación del casete de resistencia al cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

Los oligonucleótidos DpykA F y DpykA R fueron usados para la amplificación del casete de resistencia del plásmido pKD3. El producto obtenido del PCR fue entonces introducido por electroporación dentro de la cepa MG1655 (pKD46). En esta cepa expresó la enzima Red recombinasa, permitiendo la recombinación homóloga. Se seleccionaron entonces los transformados resistentes al cloranfenicol y se verificó la inserción del casete de resistencia por análisis PCR con los oligonucleótidos *pykA F* y *pykAR* que se muestran a continuación. La cepa retenida se denominó MG1655 Δ *pykA::Cm*.

PykA F (SEC ID N° 15): ggcaattaccctcgacgtaccgg (homóloga a la secuencia de 1935338 a 1935360).

PykA R (SEC ID N° 16): cgccttaacagatcatccatcgg (homóloga a la secuencia de 1935401 a 1937425).

Construcción de MG1655 Δ pykF

Para eliminar el gen *pykF*, se utilizó la estrategia recombinante homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia al cloranfenicol o la kanamicina dentro de los genes considerados. Con esta finalidad fueron utilizados los siguientes oligonucleótidos:

DpykF F (SEC ID N° 17)

cccaccttctcaacttaaagactaagactgtcatgaaaaagaccaaattgttgccat
cggaccgaaaaccgaa**TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG**

con

- una región (minúscula) homóloga a la secuencia (1753689 – 1753767) de la región *pykF* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (mayúscula en negrita) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

DpykF R (SEC ID N° 18)

ggacgtgaacagatgcgggttagtagtgccgctcgggtaccagtgaccagaaaccataactacaacgtcaccctttgtg**CATATGAATATCCTCCTTAG**

con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (1755129 – 1755051) de la región *pykF* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (mayúscula, negrita) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

Los oligonucleótidos DpykF F y DpykF R fueron utilizados para amplificar el casete de resistencia a la kanamicina del plásmido pKD4. El producto obtenido de la PCR se introdujo luego por electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). Esta cepa expresó la enzima recombinasa Red, lo que permitió la recombinación homóloga. Los transformados resistentes a la kanamicina fueron seleccionados verificándose la inserción del casete de resistencia mediante un análisis por PCR con los oligonucleótidos pykF F y pykF R, que se muestran más abajo. La cepa retenida se denominó MG1655 *DpykF::Km*.

PykF F (SEC ID N° 19): gcgtaacctttccctggaacg (homólogos a la secuencia de 1753371 a 1753392).

PykF R (SEC ID N° 20): gcgttgctggagcaacctgccagc (homólogos a la secuencia de 1755518 a 1755495).

Construcción de MG1655 Δ purU

Para eliminar el gen *purU*, se empleó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia al cloranfenicol y a la kanamicina dentro de los genes considerados. Con esta finalidad se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

DpurU F (SEC ID N° 21)

ggtaaaaaatttaaaagtgctgcggccaataatggttgacggttacggttagcaaacactctcaacaagggtttccagc**TGTAGGCTGGAGCTGCTTC**
G

con

- una región (minúscula) homóloga a la secuencia (1287929 – 1287849) de la región *purU* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (mayúsculas, negrita) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

DpurU R (SEC ID N° 22)

ggttgcgtaatttcatccgtaacggattaaggttaaccagttattttgctggcgattaagaataatcggttcgattacc**CATATGAATATCCTCCTTAG**

con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (1286948 – 1287028) de la región *purU* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (en mayúscula, negrita) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

Se usaron los oligonucleótidos DpurU F y DpurU R para amplificar el casete de resistencia a la kanamicina del plásmido pKD4. El producto de PCR obtenido se introdujo por electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). Esta cepa expresó la enzima Red recombinasa, permitiendo la recombinación homóloga. Se seleccionaron entonces los transformados resistentes a la kanamicina y se verificó la inserción del casete de resistencia mediante un análisis PCR utilizando los oligonucleótidos purU F y purU R que se muestran más abajo. La cepa retenida se denominó MG1655 *DpurU::Km*.

PurU F (SEC ID N° 23): ggaatgcaatcgtagccacatcgc (homólogo a la secuencia de 1288447 a 1288424).

PurU R (SEC ID N° 24): gcggattcggtggaagttcaggg (homólogo a la secuencia de 1286129 a 1286452).

Construcción pCC1BAC–serA–serC

Para aumentar la expresión de los genes *serA* y *serC*, se incrementó la dosificación de genes de los dos genes en la célula productora de metionina expresando las enzimas del vector de control de copia pCC1BAC (Epicentro), utilizando los promotores adecuados.

Con esta finalidad, primero se amplificó el gen *serC* del genoma de *E. coli* utilizando los oligonucleótidos –*serC* F (*Xba*I) y *serC* R (*Hind*III). Se restringió el producto de PCR usando las enzimas *Xba*I y *Hind*III clonándolo dentro del vector pUC18 (Stratagene) restringido por las mismas enzimas de restricción. El vector resultante se denominó pUC18–*serC*.

serC F (*Xba*I) (SEC ID N° 25):

tgcTCTAGAgtccgctgtgcaaatccagaatgg

con

- una región (minúscula) homóloga a la secuencia (956619 – 956644) del gen *serC* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (mayúscula, negrita) que anida el lugar *Xba*I

serC R (*Hind*III) (SEC ID N° 26):

ccc**AAGCTT**AACTCTCTACAACAGAAATAAAAAC

con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (958028 – 958004) del gen *serC* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (mayúscula, negrita) que anida el lugar *Hind*III

Subsecuentemente el gen *serA* fue amplificado del genoma de *E. coli* utilizando los oligonucleótidos *serA* F (*Xba*I) y *serA* R (*Sma*I–*Hind*III). Se restringió el producto de la PCR utilizando las enzimas *Xba*I y *Sma*I y clonándolo en el vector pUC18–*serC* restringido por las mismas enzimas de restricción. Se verificó el vector resultante mediante secuenciamiento y se denominó pUC18–*serA*–*serC*.

serA F (*Xba*I) (SEC ID N° 27):

ctag**TCTAGA**ttagtacagcagacgggcgcg

con

- una región (minúscula) homóloga a la secuencia (3055198 – 3055218) del gen *serA* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (mayúscula) que anida el sitio *Xba*I

serA R (*Sma*I – *Hind*III) (SEC ID N° 28):

tcc**CCCGG**GaagcttCCGTCAGGGCGTGGTGACCG

con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (3056878 – 3056859) del gen *serA* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
- una región (negrita) que anida los sitios *Sma*I y *Hind*III

Para transferir los genes *serA* y *serC* dentro del vector de control de copia pCC1BAC, se restringió al vector pUC18–*serA*–*serC* con la enzima *Hind*III y luego éste fue clonado en el CC1BAC (Epicentro) preparado para clonar *Hind*III.

La construcción resultante se verificó y se denominó pCC1BAC–*serA*–*serC*.

Construcción del vector pCC1BAC–*serB*–*serA*–*serC*

Para aumentar la expresión de los genes *serA*, *serB* y *serC*, la dosificación de genes de los tres genes se incrementó en la célula productora de metionina mediante la expresión de las enzimas del vector de control de copia pCC1BAC (Epicentro), utilizando los propios promotores.

Con esta finalidad, se amplificó el gen *serB* del genoma de *E. coli* utilizando los oligonucleótidos *serB* (*SphI*) y *serB* (*SmaI*). El producto de PCR se restringió utilizando las enzimas *SphI* y *SmaI* y clonándolo luego dentro del vector pUC18-*serA-serC* restringido por las mismas enzimas de restricción. El vector resultante se denominó pUC18-*serB-serA-serC*.

- 5 *serB* (*SphI*) (SEC ID N° 29):
- atgc**GCATGCC**CCACCCTTTGAAAATTTGAGAC
- 10 con
- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (4622362 – 4622383) del gen *serB* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
 - 15 – una región (mayúscula, subrayada) que anida el sitio *SphI*

serB (*SmaI*) (SEC ID N° 30):

- 20 gcatgtcgacat**CCCGGG**GCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAGTGTGATTACTTCTGATTCAGGCTGCC
- con
- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (4623433 – 4623412) del gen *serB* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
 - 25 – una región (mayúscula, subrayada) que anida en el lugar *SmaI*
 - una región (mayúscula, cursiva) para la secuencia terminal del bacteriófago T7
 - 30 (Genbank V01146)

Para transferir los genes *serA*, *serB* y *serC* dentro del vector de control de copia pCC1BAC, se restringió el vector pUC18-*serB-serA-serC* con la enzima *HindIII*, clonándolo luego dentro del pCC1BAC (Epicentro) preparado para clonar *HindIII*.

- 35 La construcción resultante se verificó y luego se denominó pCC1BAC-*serB-serA-serC*.

Construcción del vector pCC1BAC-*serB-glyA-serA-serC*

- 40 Para incrementar la expresión de los genes *serA*, *serB*, *serC* y *glyA*, se aumentó la dosificación de genes de los tres genes en la célula productora de metionina mediante la expresión de las enzimas del vector de control de copia pCC1BAC (Epicentro) usando sus propios promotores.

- 45 Con esta finalidad, se amplificó el gen *glyA* del genoma de la *E. coli* utilizando los oligonucleótidos PglyA F (*HindIII*) y *glyA* R (*EcoRI-HindIII*). El producto de la PCR se restringió usando la enzima *HindIII*, amortiguada con el fragmento de Klenow y clonado dentro del vector pUC18-*serB-serA-serC* restringido mediante la enzima de restricción *SmaI*. El vector resultante se denominó pUC18-*serB-glyA-serA-serC*.

PglyA F (*HindIII*) (SEC ID N° 31):

- 50 TCATCGGATCCATCAAGCTTGA**AAGAATGTGATGAAGTG**
- con
- 55 – una región (mayúscula, negrita) homóloga de la secuencia (2683760 – 2683742) de la región *glyA* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),
 - una región (mayúscula, subrayado) que anida el sitio *HindIII*

60 *glyA* R (*EcoRI-HindIII*) (SEC ID N° 32):

- ATCTAGTAAGCTTAGTGA**AATTCGTTACGACAGATTTGATGGCGCG**
- con
- 65 – una región (mayúscula, cursiva) homóloga a la secuencia (2682084 – 2682061) de la región *glyA* (secuencia

de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),

- una región (mayúscula, subrayada) que anida los sitios *HindIII* y *EcoRI*.

5 Para transferir los genes *serA*, *serB*, *serC* y *glyA* dentro del vector de control de copia pCC1BAC, se restringió el vector pUC18-*serB-glyA-serA-serC* con la enzima de restricción *HindIII* y luego se clonó con el pCC1BAC(Epicentre) preparado para clonar *HindIII*.

La construcción resultante se verificó y se denominó pCC1BAC-*serB-glyA-serA-serC*.

10

Construcción del vector pJB137-lpd

El gen *lpd* del genoma de la *E. coli* fue amplificado usando los oligonucleótidos lpd F (*HindIII*) y lpd R (*EcoRI*). Se restringió el producto de la amplificación por PCR usando las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y luego se clonó en el vector pJB137 restringido mediante las mismas enzimas de restricción. El vector resultante se denominó pJB137-*lpd*.

15

lpd F (*HindIII*) (SEC ID N° 33):

atgcgcta**AAGCTT**GGTTATTAGCGAATAGACAAATCGG

20

con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (127644 – 127668) del gen *lpd* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),

25

- una región (mayúscula, negrita) que anida el sitio *HindIII*

lpd R (*EcoRI*) (SEC ID N° 34):

gcatgatc**GAATTC**TGCAGACGTAAAAAAGCGGCGTGG

30

con

- una región (mayúscula) homóloga a la secuencia (129404 – 129380) del gen *lpd* (secuencia de referencia en el sitio <http://www.ecogene.org/>),

35

- una región (mayúscula, negrita) que anida el sitio *EcoRI*

La construcción resultante fue verificada y se denominó pJB137-*lpd*.

40

Integración de mutaciones individuales en la cepa1

A continuación, las siguientes cepas fueron derivadas de la cepa $\Delta metJ metA^*11 Ptrc-metH Ptrc-metF$ por un transducción por fago P1 con la eliminación, cuando fuera necesario, de los casetes de resistencia. Cepas construidas

45

$\Delta metJ metA^*11 Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH$

$\Delta metJ metA^*11 Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH$

50

$\Delta metJ metA^*11 Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH \Delta pykF \Delta pykA$

$\Delta metJ metA^*11 Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH \Delta pykF \Delta pykA Ptrc09-gcvTHP$

55

$\Delta metJ metA^*11 Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH \Delta pykF \Delta pykA Ptrc09-gcvTHP \Delta purU$

$\Delta metJ metA^*11 Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH \Delta pykF \Delta pykA Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF$

60

$\Delta metJ metA^*11 Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH \Delta pykF \Delta pykA Ptrc09-gcvTHP \Delta purU Ptrc36-ARNmst17-metF$

La cepa $\Delta metJ metA^*11 Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM::Cm PtrcF-cysJIH::Km$. ejemplifica la transferencia mediante la transducción P1 y eliminación de los casetes de resistencia. Todas las demás construcciones de las cepas fueron realizadas de la misma manera, a excepción de las cepas que contienen *Ptrc36-ARNmst17-metF* (ver a continuación).

65

ES 2 600 036 T3

Se utiliza el método de transducción del fago P1 para transferir la construcción promotora *P_{trcF}-cysPUWAM::Cm* dentro de la cepa MG1655 Δ *metJ metA*11 P_{trc-metH P_{trc-metF}}*. Se implementó el protocolo seguido en dos etapas, consistentes en la preparación del lisado de fago de la cepa MG1655 *P_{trcF}-cysPUWAM::Cm* y la subsiguiente transducción dentro de la cepa MG1655 Δ *metJ metA*11 P_{trc-metH P_{trc-metF}}*

Preparación del lisado del fago P1:

- Inocular con 100 μ l de un cultivo nocturno de la cepa MG1655 *P_{trcF}-cysPUWAM::Cm* en 10 ml de LB + Km 50 μ g/ml + glucosa 0.2% + CaCl₂ 5 mM.
- Incubar durante 30 min a 37°C con agitación.
- Añadir 100 μ l del lisado del fago P1 preparado con la cepa MG1655 (aproximadamente 1.10⁹ fagos/ml)
- Agitar a 37°C durante 3 horas hasta que todas las células estuvieron lisadas.
- Añadir 200 μ l de cloroformo y agitación con vórtex.
- Centrifugar durante 10 min a 4500 g para eliminar restos de células.
- Transferir el sobrenadante a un tubo estéril agregando 200 μ l de cloroformo.
- Guardar el lisado a 4°C.

Transducción

- Centrifugar 5 ml de un cultivo nocturno de la cepa MG1655 Δ *metJ metA*11 P_{trc-metH P_{trc-metF}}* en medio LB durante 10 min a 1500g
- Suspender el sedimento celular en 2.5 ml de 10 mM MgSO₄, 5 mM CaCl₂
- Tubos de control: 100 μ l de células
- 100 μ l de fagos P1 de la cepa MG1655 *P_{trcF}-cysPUWAM::Cm*
- Tubo de ensayo: 100 μ l de células + 100 μ l de fagos P1 de la cepa MG1655 *P_{trcF}-cysPUWAM::Cm*
- Incubar durante 30 min a 30°C sin agitar.
- Añadir 100 μ l de citrato sódico 1 M en cada tubo y mezclar en vórtex.
- Añadir 1 ml de LB
- Incubar durante 1 hora a 37°C, con agitación
- Extender sobre placas LB + Cm 50 μ g/ml tras centrifugar los tubos durante 3 min a 7000 rpm.
- Incubar durante la noche a 37°C.

Verificación de la cepa

Se seleccionaron los transformados resistentes al cloranfenicol y se verificó la presencia del vector construido MG1655 *P_{trcF}-cysPUWAM::Cm* por análisis PCR con los oligonucleótidos descritos anteriormente para la verificación de la cepa MG1655 *P_{trcF}-cysPUWAM::Cm*. La cepa retenida se denominó Δ *metJ metA*11 P_{trc-metH P_{trc-metF P_{trcF}-cysPUWAM::Cm}}*. A continuación, se introdujo el alelo *P_{trcF}-cysJIH* usando el procedimiento de transducción descrito anteriormente. La cepa resultante se denominó Δ *metJ metA*11 P_{trc-metH P_{trc-metF P_{trcF}-cysPUWAM::Cm P_{trcF}-cysJIH::Km}}*.

Para introducir los *pykA* y *pykF* suprimidos, se eliminaron los casetes de resistencia de la cepa Δ *metJ metA*11 P_{trc-metH P_{trc-metF P_{trcF}-cysPUWAM::Cm P_{trcF}-cysJIH::Km}}*.

Con esta finalidad, el plásmido pCP20 portador de FLP recombinasa que actúa en los lugares FRT de los casetes de resistencia fue introducido en la cepa recombinante mediante electroporación. Luego de una serie de cultivos a 42°C, la pérdida de los dos casetes fue verificada por análisis PCR. La cepa retenida se denominó Δ *metJ metA*11 P_{trc-metH P_{trc-metF P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH}}*. Entonces los borrados de los alelos *pykA* y *pykF* pudieron

ser introducidos por vía de la transducción. Similarmente, tras la eliminación de los casetes correspondientes, se introdujo el borrado del gen *purU* y la construcción del complejo de escisión de glicina sobreexpresado *P_{trc}09-gcvTHP*.

5 Por razones de proximidad la construcción *P_{trc}36-ARNmst17-metF* no pudo ser introducida por medio de transducción P1 pero fue construida por introducción vía PCR.

Con esta finalidad, se utilizó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia al cloranfenicol o de kanamicina cerca de los genes en
10 cuestión. Con esta finalidad se usaron los siguientes oligonucleótidos:

P_{trc}36-ARNmst-metF (SEC ID N° 35) (

15 GGCTCTGATTCAGGGCATCCCGCTGGCTGGCGTGAAAAAGCTCATAATATACCTCCTcgtcaacaatatctcactcgagat
aactccaccTATTCCACACATTATACGAGCCGG

Mayúscula, en negrita: Sitio de unión de ribosomas y la región -10

20 Minúscula: secuencia de estabilización del ARN

Mayúscula, en cursiva: parte del promotor *P_{trc}*

P_{trc}-metF F (SEC ID N° 36)

25 ccttcatttacatctggacgtctaaacggatagatgtgcacacacacacataataactacaagcattgatgaggaaggtcacactggctcaccttcgggtgggcct
ttctgcCATATGAATATCCTCCTTAG

con:

- 30 – una región (minúscula) homóloga a la secuencia (4130114–4130195) de la región del gen *metF* (secuencia de referencia en el sitio <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>),
- una región (minúscula, cursiva) homóloga a la secuencia del extremo de bacteriófago T7 (Genbank V01146)
- 35 – una región (mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640–6645),

Para el ADN aislado por PCR del MG1655 *metA*11 DmetJ::Cm P_{trc}-metF::Km* se utilizó como matriz la solicitud de patente WO 2007077041.

40 Los oligonucleótidos *P_{trc}-metF F* y *P_{trc}36-ARNmst-metF* fueron utilizados para amplificar el casete de resistencia a la kanamicina del plásmido pKD4. El producto de la PCR obtenido, se introdujo por electroporación en la cepa *ΔmetJ metA*11 P_{trc}-metH P_{trc}-metF P_{trc}-cysPUWAM P_{trc}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc}09-gcvTHP ΔpurU* (pKD46), en la
45 cual la enzima de Red recombinasa expresada permite la recombinación homóloga. Se seleccionaron los transformados resistentes a la kanamicina y se verificó la inserción del casete de resistencia por análisis PCR con los oligonucleótidos *P_{trc}-metFv F* y *P_{trc}-metFv R* definidos a continuación.

P_{trc}-metFv F (SEC ID N° 37): GCCCGGTACTCATGTTTTCGGGTTTATGG (homóloga a la secuencia de 4129866 a 4129894).

50 *P_{trc}-metFv R* (SEC ID N° 38): CCGTTATTCCAGTAGTCGCGTGCAATGG (homóloga a la secuencia de 4130524 a 4130497).

La cepa resultante se denominó *ΔmetJ metA*11 P_{trc}-metH P_{trc}-metF P_{trc}-cysPUWAM P_{trc}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc}09-gcvTHP ΔpurU P_{trc}36-ARNmst17-metF:Km*.

Seguidamente, el plásmido (pME101-*thrA*1-cysE-PgapA-metA*11*) se introdujo en las cepas descritas anteriormente obteniéndose las cepas:

60 cepa1 *P_{trc}-cysPUWAM P_{trc}-cysJIH*

cepas1 *P_{trc}-cysPUWAM P_{trc}-cysJIH ΔpykF ΔpykA*

cepas1 *P_{trc}-cysPUWAM P_{trc}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc}09-gcvTHP*

65 cepas1 *P_{trc}-cysPUWAM P_{trc}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc}09-gcvTHP ΔpurU*

cepa1 *PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF*

cepa1 *PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP ΔpurU Ptrc36-ARNmst17-metF*

En determinadas cepas los plásmidos *pJB137-lpd*, *pCC1BAC-serA-serC*, *pCC1BAC-serB-serA-serC* o *pCC1BAC-serB-glyA-serA-serC* fueron introducidas obteniéndose:

cepa1 *PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP* (*pJB137-lpd*)

cepa1 *PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP ΔpurU* (*pCC1BAC-serA-serC*)

cepa1 *PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP ΔpurU Ptrc36-ARNmst17-metF* (*pCC1BAC-serA-serC*)

cepa1 *PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP ΔpurU Ptrc36-ARNmst17-metF* (*pCC1BAC-serB-serA-serC*)

cepa1 *PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP ΔpurU Ptrc36-ARNmst17-metF* (*pCC1BAC-serB-glyA-serA-serC*)

Evaluación de las cepas productoras de metionina.

Las cepas de producción fueron evaluadas inicialmente en matraces Erlenmeyer pequeños. Se hizo crecer un precultivo de 5.5 mL en un medio mixto (10 % medio LB (Sigma 25 %) con 2.5 g.L⁻¹ glucosa y medio mínimo PC1 90 %), el que fue utilizado para inocular un cultivo de 50 mL a una DO₆₀₀ de 0.2 en medio PC1. De ser necesario, se agregó kanamicina y espectinomicina a una concentración de 50 mg.L⁻¹, y cloranfenicol a 30 mg.L⁻¹. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 6 a 7, se cuantificaron los ácidos extracelulares por HPLC tras una derivación OPA/Fmoc y se analizaron otros metabolitos relevantes por HPLC, usando detector de índice de refracción (ácidos orgánicos y glucosa) y por GC-MS tras sililar.

Tabla 1: Composición de medio mínimo (PC1)

Compuesto	Concentración
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040 g.L ⁻¹
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020 g.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200 g.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080 g.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,0010 g.L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0004 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g.L ⁻¹
Ácido cítrico	6 g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	10,5 g.L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	2 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8 g.L ⁻¹
NH ₄ Cl	0,13 g.L ⁻¹
NaOH 4M	Ajustado a pH 6,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,04 g.L ⁻¹
Tiamina	0,01 g.L ⁻¹
Glucosa	10 g.L ⁻¹
Tiosulfato de amonio	5,6 g.L ⁻¹
Vitamina B12	0,01 g.L ⁻¹

MOPS	5 g.L ⁻¹
IPTG	0,0024 g.L ⁻¹

Como se puede apreciar en la tabla 2, el rendimiento de metionina/glucosa (Y_{met}) se incrementa con la sobreexpresión de *cysJIH* y *cysPUWAM*. La eliminación de los alelos que codifican a la piruvato cinasa *pykA* y *pykF* pueden aumentar aún más el rendimiento metionina/glucosa. La eliminación de la formil-THF desformilasa codificada por el gen *purU* promueve aún más el rendimiento metionina/glucosa. Una expresión adicional del gen *metF* mediante la construcción *Ptrc36-ARNmst17-metF* proporciona un rendimiento aun mayor de metionina/glucosa. La sobreexpresión de *serA* *serC* y *serB* también incrementa el rendimiento metionina/glucosa, y la expresión adicional de *glyA* incrementa aún más el rendimiento de la metionina/glucosa.

5 **Tabla 2.** Rendimiento de la metionina (Y_{met}) en % g metionina/g glucosa producida en un cultivo de lotes con cepas descritas anteriormente. n.d. significa no determinado. Para una definición precisa del rendimiento de metionina/glucosa ver a continuación. DS denota la desviación estándar para Y_{met} .

* ensayo realizado con 5g/l de glucosa en el cultivo final.

15

Genotipo	Y_{met}	DS	Y homolantionina
cepa1	6,65	0,25	nd
cepa1 <i>PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH</i>	8,53	0,4	3,10
cepa1 <i>PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA</i>	10,16	0,27	1,98
cepa1 <i>PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP</i>	10,14	0,44	1,82
cepa1 <i>PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP ΔpurU</i>	10,33	0,06	0,71
cepa1 <i>PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF</i>	9,68	1,1	0,8
cepa1 <i>PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP ΔpurU Ptrc36-ARNmst17-metF</i>	10,83	0,73	0,8
cepa1 <i>PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP (pJB137-lpd)</i>	9,75*	nd	0,3*
cepa1 <i>PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP ΔpurU Ptrc36-ARNmst17-metF (pCC1BAC serB-serA-serC)</i>	12,54	0,19	0,1
cepa1 <i>PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykF ΔpykA Ptrc09-gcvTHP ΔpurU Ptrc36-ARNmst17-metF (pCC1BAC-serB-glyA serA-serC)</i>	12,85	0,44	0,14

Determinación de los cambios en las actividades de las enzimas CysM, cysJI, PykA/F, GcvTHP y Lpd, serA, serB, serC y glyA

20 Para validar los cambios en la expresión de CysM, CysJI, PykA/F, GcvTHP, SerA, SerB, SerC, GlyA y Lpd se determinaron las actividades de las correspondientes enzimas en extractos crudos.

25 Para la determinación *in vitro* de las actividades de las enzimas, se cultivaron cepas de *E. coli* en medio mínimo, tal como se ha descrito anteriormente y éstas fueron cosechadas en la fase de medio log. Las células fueron suspendidas en solución tampón frío de fosfato de potasio y sonicados sobre hielo (sonificador de Branson, 70W). En dos casos (mostrados en la tabla 3 en casilleros grises), las proteínas fueron extraídas utilizando un sistema de extracción de Precelly (Bertin technologies, France): Las células fueron suspendidas en solución tampón fría de fosfato de potasio, mezcladas con perlas de vidrio de 0,1 mm y extraídos con proceso de 30 s. Tras la centrifugación, se cuantificaron las proteínas contenidas en el sobrenadante.(Bradford, 1976).

30 La actividad de la sulfocisteína sintasa (CysM) fue determinada por cuantificación mediante LC-MS de la sulfocisteína producida. Para el ensayo, se colocó 25 µg/mL de proteína en una solución tampón de fosfato de potasio (0.5 M, pH 6.5) conteniendo 25 mM de o-acetilserina y 25 mM de tiosulfato. La reacción se llevó a cabo durante 10 minutos a 30°C, y luego se procesó para la cuantificación por LC-MS.

35 La actividad sulfito reductasa (CysJI) fue ensayada por el método de la desaparición del NADPH. La mezcla para la reacción estaba compuesta por 10 mM de sulfito ácido de sodio y 10 mM NADPH en Tris-HCl (0.5 M, pH 7.5). La reacción se comenzó adicionando 30 µL de extracto de proteína seguido de 340 nm durante 30°C min en un espectrofotómetro termostatzado.

40 Para la determinación de la actividad de la piruvato cinasa (PykA/F), se llevó a cabo un ensayo acoplado de lactato

deshidrogenasa (LDH). 10 µL de extracto de proteína se agregaron a una solución tamponada con Tris-HCl (0.5 M, pH 7.5) conteniendo 10 mM DTT, 100 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 10 mM PEP, 50 mM AMP, 10mM fructuosa, 1,6 bis fosfato, 10 mM NADH y 10 unidades de LDH. La reacción se siguió a 340 nm a 30°C por 30 min en un espectrofotómetro termostatzado.

Se estimó la actividad del GcvT_{HP}, componentes del complejo de clivaje de la glicina, midiendo la producción de CO₂ que ocurre durante la reacción de descarboxilación de la glicina. La reacción se llevó a cabo en un brazo lateral de un frasco de Warburg conteniendo 0.5 M de solución tampón de fosfato de potasio a un pH 7,2 mM, fosfato de piridoxal, 200 mM de lipoamida y 1-¹⁴C-glicina 1M a 50 µCi/mL. Se colocaron 400 µL de hiamina en el centro del pocillo del frasco y todo el sistema de reacción se preincubó durante 5 min a 37°C. Se inició la reacción enzimática agregando 2 mg de proteína manteniendo la temperatura a 37°C. La reacción se detuvo agregando a través del tabique del brazo lateral, 500 µL de 6N H₂SO₄, y el ¹⁴C-CO₂ desprendido se atrapó con la tiamina incubando durante otra hora a 37°C. Se quitó el líquido del pocillo central y se agregó a 3mL de líquido de centelleo antes de determinar la CPM en un contador de centelleo.

Se determinó la actividad de la metilén tetrahidrofolato reductasa (MTHFR, MetF) por derivación del portador de metilo desmetilado radioactivo. La mezcla de reacción contenía fosfato de potasio (50 mM, pH 6.7), 0.02 % BSA (solución de 2 % BSA en 30 mM EDTA), 37.5 µM FAD, 140 µM menadiona y 300 µM 5-¹⁴C-Metil-THF a 925 dpm/nmol. Tras 5 min de preincubación a 37°C, se agregó 100 µL de extracto de proteína a una concentración de 1 µg de proteína/µL. La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 37°C y se detuvo agregando 300 µL de una solución de 3 mg/mL de dimedona en acetato de sodio (1M, pH 4.7). La solución de reacción fue entonces incubada durante 2 min a 100°C y enfriada sobre hielo durante 5 min. Se agregó entonces 3 mL de tolueno y se centrifugó durante 5 min a 1500 G a temperatura ambiente. Se tomó 1.5 mL de la fase acuosa y se agregó a 3 mL de líquido de centelleo. Se determinó la CPM con un contador de centelleo y se calculó la actividad.

La actividad de la lipoamida deshidrogenasa de la Lpd se determinó sobre la base de la reducción de la lipoamida con NADH como donante de electrones. Se agregaron EDTA 10 mM, NADH 1 mM y NAD⁺ 25 mM y 1 µg de extracto de proteína a una solución tampón de Tris-HCl (0.5 M, pH 8.0). La reacción se inició agregando 200 mM de lipoamida y se siguió la desaparición de NADH a 340 nm y 30°C durante 30 min en un espectrofotómetro termostatzado.

Se monitoreó la actividad de la fosfoglicerato deshidrogenasa de la SerA siguiendo la desaparición de NADH. Se colocó 30 µL de extracto de proteína en una solución de Tris-HCl (10mM, pH 8.8) conteniendo 360 µM de 3-P-hidroxi piruvato. Se agregaron 200 µM de NADH para iniciar la reacción y se siguió la desaparición de NADH a 340 nm a 30°C durante 30 min en un espectrofotómetro termostatzado.

Se determinó la actividad de la fosfoserina fosfatasa aportada por la proteína SerB se determinó midiendo la serina producida por medio de GC-MS. La mezcla de reacción contenía TEA-HCL (10 mM, pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 1 mM O-fosfo-L-serina y 15 µg de proteína. Se incubó la reacción a 37°C y se detuvo a 10 y 30 minutos mediante la adición de acetona para luego ser procesada nuevamente por cuantificación mediante GC-MS.

Se midió la actividad de la fosfoserina-amino-transferasa de SerC acoplando el ensayo con la glutamato deshidrogenasa. La mezcla de la reacción se tamponó con Tris-HCl (50 mM, pH 8.2) conteniendo 32 mM de acetato de amonio, 2 mM de glutamato, 2 uts de glutamato deshidrogenasa y 200 µM NADH. Se inició la reacción agregando 30 µL de extracto de proteína y la desaparición del NADH se siguió a 340 nm a 30°C durante 30 min en un espectrofotómetro termostatzado.

Se midió la actividad de la serina hidroximetil transferasa monitoreando la glicina producida por GC-MS. Se agregaron 30 µg de proteína a una solución conteniendo fosfato de potasio (50 mM, pH 7.3), 400 µM de tetrahidropteril glutamato, 10 mM de L-serina y 500 µM de DTT. Se ejecutó la reacción durante 10 minutos a 37°C y se detuvo tras 10 minutos mediante la adición de acetona y luego se procesó para la cuantificación mediante GC-MS.

Tabla 3. Las actividades están expresadas en µU/mg de proteína para la cisteína sintasa B (CysM), sulfito reductasa (CysJI), piruvato cinasa (PykA/F), metilén-tetrahidrofolato reductasa (MetF), lipoamida deshidrogenasa (Lpd), 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA), fosfoserina fosfatasa (SerB), fosfoserina-amino-transferasa (SerC), serina hidroximetil transferasa (GlyA) en cepas productoras de metionina. La actividad de la glicina descarboxilasa de GcvT_{HP} es en µU/mg de proteína. Las actividades marcadas en gris fueron obtenidas de cultivos extraídos en un sistema Precelly.

LDC: límite de cuantificación; ND: no determinado

Genotipo	CysM	CysJI	PykA/F	gcvT _{HP}	MetF	lpd
cepa1	54	13	162	ND	ND	ND
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH</i>	318	18	216	10	ND	ND
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH</i>	ND	ND	<LDC	12	ND	ND

$\Delta pykF \Delta pykA$						
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH <math>\Delta pykF \Delta pykA P_{trc09}-gcvTHP</math></i>	514	ND	<LDC	19	7	592
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH <math>\Delta pykF \Delta pykA P_{trc09}-gcvTHP P_{trc36}-ARNmst17-metF</math></i>	ND	ND	ND	ND	53	ND
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH <math>\Delta pykF \Delta pykA P_{trc09}-gcvTHP</math></i> (pJB137- <i>lpd</i>)	ND	ND	ND	ND	ND	1626
	SerA	SerB	SerC	GlyA		
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH <math>\Delta pykF \Delta pykA P_{trc09}-gcvTHP \Delta purU P_{trc36}-ARNmst17-metF</math></i>	22	46	39	341		
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH <math>\Delta pykF \Delta pykA P_{trc09}-gcvTHP \Delta purU P_{trc36}-ARNmst17-metF</math></i> (pCC1BAC - <i>serA-serC</i>)	47	ND	70	ND		
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH <math>\Delta pykF \Delta pykA P_{trc09}-gcvTHP \Delta purU P_{trc36}-ARNmst17-metF</math></i> (pCC1BAC <i>serB-serA-serC</i>)	50	217	88	598		
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH <math>\Delta pykF \Delta pykA P_{trc09}-gcvTHP \Delta purU P_{trc36}-ARNmst17-metF</math></i>	43	10	45	279		
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH <math>\Delta pykF \Delta pykA P_{trc09}-gcvTHP \Delta purU P_{trc36}-ARNmst17-metF</math></i> (pCC1BAC- <i>serB-glyA-serA-serC</i>)	87	48	75	715		

5 Como se puede apreciar en la tabla 3, las construcciones *P_{trcF}-cysPUWAM*, *P_{trcF}-cysJIH P_{trc09}-gcvTHP* y *P_{trc36}-ARNmst17-metF*, pJB137-*lpd*, pCC1BAC-*serB-serA-serC* y pCC1BAC-*serB-glyA-serA-serC* todas incrementan la actividad de la correspondiente enzima cuando se compara con la cepa no modificada para el correspondiente alelo. La supresión de *pykA* y *pykF* conduce a una pérdida total de la actividad piruvato cinasa.

Validación de la producción de metionina bajo condiciones de fermentación

10 Las cepas que produjeron cantidades sustanciales de metabolitos de interés, fueron a continuación sometidas a ensayo bajo condiciones de producción en fermentadores de 2.5 L (Pierre Guerin) usando una estrategia de lotes alimentados con privación de fosfato.

15 El medio de precultivo B1, contenía sólo 50 mM de fosfato para evitar introducir fosfato adicional al medio del reactor a través del inóculo. Para detener el crecimiento a una concentración celular de 30 g.L⁻¹, se agregó fosfato de 28.7 mM al medio mineral B2. Los medios de lotes alimentados (F1 y F2) estaban libres de fosfato.

20 Brevemente, se utilizó un cultivo de 8 horas en 10 mL LB de medio con 2.5 g.L⁻¹ de glucosa para inocular un precultivo de 12 h en medio mínimo (B1 sin tiosulfato de amonio pero con MOPS 5 g.L⁻¹). Estas incubaciones fueron llevadas a cabo en frascos cerrados de 500 mL conteniendo 50 mL de medio mínimo (B1) en un agitador rotatorio a (200 rpm) a 37°C.

25 Una tercera etapa de precultivo se llevó a cabo en un biorreactor (Sixfors) que fue llenado con 200 mL de medio mínimo (B1) inoculado a una concentración de biomasa de 0.05 g.L⁻¹ con 1.5 mL de un precultivo concentrado (5 g.L⁻¹). La temperatura de precultivo se mantuvo constante a 37°C y el pH se mantuvo automáticamente a un valor de 6.8 usando una solución al 10 % de NH₄OH. La concentración de oxígeno disuelto se ajustó en forma continua a un valor del 30 % de la presión parcial del aire de saturación mediante ingreso de aire y/o agitación. Una vez agotada la glucosa del medio del reactor, la alimentación por lotes se comenzó con un flujo inicial de 0.7 mL.h⁻¹, incrementando exponencialmente durante 24 horas con una tasa de crecimiento de 0.18 h⁻¹ con la finalidad de obtener una concentración celular final de aproximadamente 24 g.L⁻¹.

30 **Tabla 4:** Concentración del medio mineral de lotes de precultivo (B1)

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ , 2H ₂ O	0,0130
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,0015
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,0150

ES 2 600 036 T3

CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
H ₃ BO ₃	0,0030
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0025
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
CaCl ₂	0,0800
Ácido cítrico	1,7000
KH ₂ PO ₄	4,50
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	2,50
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,10
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,90
Fe(III) citrato H ₂ O	0,1064
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	1
EDTA	0,0084
Tiamina	0,01
Glucosa	5
Vitamina B12	0,01
NaOH 8 N	Ajustado a pH 6,8

Tabla 5: Composición de medio mineral de lotes alimentados de precultivo (F1)

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	0,0104
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0012
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0120
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0020
H ₃ BO ₃	0,0024
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0020
MgSO ₄	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,30
Na ₂ SO ₄	8,90
Fe(III) citrato H ₂ O	0,0524
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	24,80
EDTA	0,0067
Tiamina	0,01
Glucosa	500
Vitamina B12	0,01
NH ₄ OH 28%	Ajustado a un pH 6,8

5 Tabla 6: Composiciones de medio mineral de lotes de cultivo (B2 y B3)

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹) B2	Concentración (g.L ⁻¹) B3
Zn(CH ₃ COO) ₂ . 2H ₂ O	0,0130	0,0130
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,0015	0,0015
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,0150	0,0150
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025	0,0025
H ₃ BO ₃	0,0030	0,0030
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0025	0,0025
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	1

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0800	0,0800
Ácido cítrico	1,70	1,70
KH ₂ PO ₄	2,50	16,42
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	1,38	9,12
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,6040	4
Fe(III) citrato H ₂ O	0,11	0,11
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	3,70	4,88
EDTA	0,0080	0,0080
Tiamina	0,01	0,01
Glucosa	10	10
Vitamina B12	0,01	0,01
NaOH 8 N	Ajustado a un pH 6,8	Ajustado a un pH 6,8
IPTG	0,0024	0,0024

Tabla 7: Composición de medio de lotes alimentados de cultivo (F2)

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ . 2H ₂ O	0,0104
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,0012
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,0120
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0020
H ₃ BO ₃	0,0024
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,0020
Fe(III) citrato H ₂ O	0,0524
MgSO ₄	5,0000
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	39,0900
EDTA	0,0067
Tiamina	0,0100
Glucosa	500,0000
Vitamina B12	0,0100
IPTG	0,0190

- 5 A continuación, se llenaron unos fermentadores de 2.5L (Pierre Guerin) con 600 mL de medio mínimo (B2) y fueron inoculados a una concentración de biomasa de 2.1 g.L⁻¹ con un volumen de precultivo de 45 a 60 mL.

10 La temperatura de cultivo se mantuvo constante a 37°C y el pH se mantuvo al valor de trabajo de (6.8) por adición automática de soluciones de NH₄OH (NH₄OH 10% por 10 horas y al 24% hasta el final del cultivo). La velocidad de agitación inicial se fijó en 200 rpm durante la fase de lotes y luego se incrementó a 1000 rpm durante la etapa lotes alimentados. El flujo inicial de aire se fijó en 40 NL.h⁻¹ durante la fase de lotes y se incrementó a 100 NL.h⁻¹ en el principio de la fase de lotes alimentados. La concentración del oxígeno disuelto se mantuvo en valores entre 20 y 40%, preferentemente con 30% de saturación incrementando la agitación.

- 15 Cuando la masa de células alcanzó una concentración próxima 5 g.L⁻¹, se iniciaron los lotes alimentados con un flujo inicial de 5 mL.h⁻¹. La solución de alimentación se inyectó con un perfil sigmoideo con un flujo en aumento que alcanzó 21 mL.h⁻¹ luego de 21 horas. Las condiciones precisas de alimentación se calcularon mediante la ecuación:

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

- 20 donde Q(t) es el flujo de alimentación en mL.h⁻¹ para un volumen de reactor de 600 mL con p1 = 1.15, p2 = 18.32, p3 = 0.270, p4 = 5.

- 25 Tras 21 horas de lotes alimentados, la concentración celular alcanzó 30 g.L⁻¹, se agotó el fosfato del medio y las células entraron en una fase de privación de fosfato. En ese punto, la inyección de la solución de alimentación se incrementó hasta un valor constante de 37 mL.h⁻¹ por 4 horas. Luego se disminuyó hasta 10 mL.h⁻¹ manteniéndose este flujo hasta el final de los lotes alimentados (50 horas).

Tabla 8. Rendimiento máximo de metionina/glucosa (NAM se contabilizó como metionina, % g/g, ver a continuación) obtenido en fermentaciones de lotes alimentados de las cepas descritas anteriormente. Para una definición precisa del rendimiento de metionina/glucosa ver a continuación.

Genotipo	Y _{met + NAM}	Y _{iso}	Y _{homolantionina}
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc09}-gcvTHP</i>	14,4 ± 1	1,3 ± 0,5	2,8 ± 0,03
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc09}-gcvTHP ΔpurU</i>	15,6 ± 1,2	1,7 ± 0,4	0,93 ± 0,13
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc09}-gcvTHP ΔpurU (pCC1BAC-serA-serC)</i>	17,2 ± 1,4	0,29 ± 0,05	0,47 ± 0,05
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc09}-gcvTHP ΔpurU P_{trc36}-ARNmst17-metF</i>	17,4 ± 0,9	2,3 ± 0,15	0,81 ± 0,3
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc09}-gcvTHP ΔpurU P_{trc36}-ARNmst17-metF (pCC1BAC serB-serA-serC)</i>	19,2 ± 1,6	0,105 ± 0,183	0,16 ± 0,05
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc09}-gcvTHP ΔpurU P_{trc36}-ARNmst17-metF (pCC1BAC-serA-serC)</i>	18,2 ± 1,9	1 ± 0,6	0,1 ± 0,02
cepa1 <i>P_{trcF}-cysPUWAM P_{trcF}-cysJIH ΔpykF ΔpykA P_{trc09}-gcvTHP ΔpurU P_{trc36}-ARNmst17-metF (pCC1BAC-serB-glyA-serA-serC)</i>	19,9 ± 0,9	0,64 ± 0,29	0,07 ± 0,03

5 Como se puede apreciar a partir de la tabla 8 la eliminación del gen *purU* aumenta significativamente el rendimiento metionina/glucosa. La producción de isoleucina se reduce significativamente por la sobreexpresión de *serA serC* del pCC1BAC-*serA-serC*. Las expresiones adicionales del gen *serB* disminuyen aún más la producción de isoleucina, aumentando el rendimiento de metionina/glucosa.

10 **Determinación del rendimiento de la metionina/glucosa (Y_{met})**

Se cuantificó la concentración extracelular de la metionina mediante HPLC tras una derivación OPA/FMOC. La concentración de NAM y la concentración residual de la glucosa se realizaron por HPLC con detector de refracción. El rendimiento de la metionina se expresó como sigue:

$$Y_{met} = \frac{\text{metionina (g)}}{\text{glucosa consumida (g)}} * 100$$

20 Cultivos de lotes:

Con la finalidad de determinar los volúmenes iniciales y finales, el frasco Erlenmeyer fue pesado vacío, con el medio y al final del cultivo. La metionina se expresó como sigue:

$$Y_{met} = \frac{\text{Metionina}_f * V_f - \text{Metionina}_0 * V_0}{\text{Glucosa}_0 * V_0 - \text{Glucosa}_f * V_f} * 100$$

25 donde Metionina₀ y Metionina_f son, respectivamente, las concentraciones iniciales y finales de metionina, Glucosa₀ y Glucosa_f son respectivamente las concentraciones iniciales y finales de la glucosa y V₀ y V_f son los volúmenes iniciales y finales.

30 Cultivos de lotes alimentados:

El volumen del fermentador se calculó sumándole al volumen inicial el volumen de soluciones agregadas para regular el pH y para alimentar el cultivo, y restando los volúmenes utilizados para muestreo y evaporación.

35 Se siguió continuamente el volumen de lotes alimentados pesando la carga de alimentación. La cantidad de glucosa inyectada se calculó sobre la base del peso del volumen inyectado, la densidad de la solución y la concentración de glucosa determinada por el método de Brix ([Glucosa]). El rendimiento de metionina se expresó como sigue:

$$Y_{met} = \frac{\text{Metionina}_i * V_i - \text{Metionina}_0 * V_0}{\text{Glucosa consumida}_i} * 100$$

40

donde Metionina₀ y Metionina_t son, respectivamente, las concentraciones de metionina iniciales y finales y V₀ y V_t los volúmenes iniciales y del instante t.

La glucosa consumida se calculó como sigue:

5

$$\text{volumen}_t \text{ alimentado} = \frac{\text{peso alimentado}_0 - \text{peso alimentado}_t}{\text{densidad de la solución de alimentación}}$$

Glucosa_t inyectada = Volumen_t alimentado * [Glucosa]

10 Glucosa_t consumida = [Glucosa]₀ * V₀ + Glucosa inyectada – [Glucosa]_{residual} * V_t

donde [Glucosa]₀, [Glucosa]_t, [Glucosa]_{residual} son, respectivamente la concentración inicial, la de la alimentación y la de la glucosa residual.

15 **La limitación o la privación de fosfato incrementa el rendimiento de la metionina/glucosa**

Con la finalidad de demostrar que la limitación de fosfato y también la privación de fosfato aumentan el rendimiento de la metionina/glucosa, se llevaron a cabo fermentaciones de lotes alimentados de la manera descrita anteriormente. Para el cultivo sin limitación o privación de fosfato, se utilizó el medio mineral B3 y el medio de lotes alimentados fue completado con F2 Na₂SO₄ (8.95 .L⁻¹) y (NH₄)₂SO₄ (8.32 g.L⁻¹). Para el cultivo desarrollado con limitación de fosfato, se introdujeron las siguientes modificaciones. El medio mineral de lotes utilizado fue B2 y el medio de alimentación de lotes alimentados fue completado con F2 con 60 mM de fosfato. La limitación del fosfato ocurrió a DO_{600nm} de 100.

25 Como se puede apreciar en la figura 2, bajo condiciones de exceso de fosfato, la DO_{600nm} aumentaba continuamente durante el cultivo, alcanzando 160 UDO al final del experimento. En el caso de la limitación y privación de fosfato, la velocidad de crecimiento celular disminuyó, comenzando con una DO_{600nm} de 100 (20 horas) hasta llegar a una DO_{600nm} de aproximadamente 120. La concentración residual de fosfato fue próxima a cero, hecho que se confirmó mediante cromatografía iónica. Como consecuencia de la privación y limitación de fosfato el rendimiento de la metionina aumentó, alcanzando un valor máximo de 0.147 y 0.139 g.g⁻¹, respectivamente, comparado con 0.124 g.g⁻¹ bajo exceso de fosfato.

Listado de secuencias

35 <110> METABOLIC EXPLORER

<120> Aumento del rendimiento de metionina

40 <130> 70412 D25824

<150> EP08804748.5
<151> 2008-09-25

45 <150> PCT/EP2008/062859
<151> 2008-09-25

<150> PCT/EP2007/060433
<151> 2007-10-02

50 <160> 38

<170> PatentIn version 3.3

55 <210> 1
<211> 128
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> CEBADOR

<400> 1
gcgcgagtga gttcttttc agtaagttaa cggccattgc gcaccctat aaatttaatg

ES 2 600 036 T3

	actttctcc acacattata cgagccggat gattaattgt caacagcttg taggctggag ctgcttcg	120 128
5	<210> 2 <211> 121 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> CEBADOR	
15	<400> 2 ccaaatcacc aaacggata taaaaccgtt actcctttca cgccggtat aaatgatg gctattatca cactggctca cctcgggtg ggcccttctg ccatatgaat atcctccta g	60 120 121
20	<210> 3 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> CEBADOR	
25	<400> 3 gcaggatttg tacgtcggtc acc	23
30	<210> 4 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> CEBADOR	
35	<400> 4 cgtcttgaac taagtcacc aggc	24
40	<210> 5 <211> 115 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> CEBADOR	
50	<400> 5 ccagtaagca aagctgttc tgccgctgt cagcgcccat aaaacagaag agattccaca cattatacga gccggatgat taattgtcaa cagctttag gctggagctg ctgcg	60 115
55	<210> 6 <211> 114 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> CEBADOR	
60	<400> 6 ggttattagt tatcgctatc ccgtctttaa tccacaccgt tgccccgtt aaccttacct tcacactggc tcacctcgg ggggccttt ctgcatatg aatatactcc ttag	60 114
65	<210> 7 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	

ES 2 600 036 T3

	<220> <223> CEBADOR	
5	<400> 7 gcagttcgac aagttcttc acc	23
	<210> 8 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
10		
	<220> <223> CEBADOR	
15	<400> 8 ccagaacaca acaccctaac atagcg	26
	<210> 9 <211> 135 <212> ADN <213> Artificial	
20		
	<220> <223> CEBADOR	
25	<400> 9 ccaccatgcg agcgccgcaa agcgtgtgtt gttcgtacaa aggagtctgt tgtccataa tatacctcct tattccacac attatacgag ccggatgatt aattgtcaac agctctgtag gctggagctg cttcg	60 120 135
30		
	<210> 10 <211> 78 <212> ADN <213> Artificial	
35		
	<220> <223> CEBADOR	
40	<400> 10 ctgtcgcgat tttgcattt ttaaccata agctaattg atgatcaatt ttacctaca tatgaatatc ctccttag	60 78
45		
	<210> 11 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
50		
	<220> <223> CEBADOR	
55	<400> 11 ctatcacacc gccagaggca ttc	23
	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
60		
	<220> <223> CEBADOR	
65	<400> 12 cccatcacac tttcatctcc cg	22
	<210> 13	

ES 2 600 036 T3

<211> 101
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> CEBADOR
 <400> 13
 cgcgcgggg gccaacgttg tacgtatgaa ctttctcac ggctcgctg aagatcacia 60
 aatgcgcgcg gataaagtc gtgtaggctg gagctgctc g 101

10 <210> 14
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CEBADOR

20 <400> 14
 cgccgcatcc ggcaacgtac ttactctacc gttaaatac gcgtggatt agtagaacc 60
 acggtactca tcacgtgcc ccatatgaat atcctccta g 101

25 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CEBADOR

<400> 15
 ggcaattacc ctgcacgtac cgg 23

35 <210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> CEBADOR

<400> 16
 ccgcctctaa cagatcatcc atcgg 25

45 <210> 17
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> CEBADOR

<400> 17
 cccatccttc tcaactaaa gactaagact gtcataaaaa agaccaaata tgttgacc 60
 atcggaccga aaaccgaatg taggctggag ctgcttcg 98

60 <210> 18
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CEBADOR

65 <400> 18
 ggacgtgaac agatgcggtg ttagtagtgc cgctcggtac cagtgacca gaaaccataa 60

ES 2 600 036 T3

	ctacaacgtc acctttgtgc atatgaatat cctccttag	99
	<210> 19	
	<211> 22	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> CEBADOR	
10	<400> 19	
	gcgtaacctt ttcctggaa cg	22
	<210> 20	
15	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> CEBADOR	
	<400> 20	
	gcgttgctgg agcaacctgc cagc	24
25	<210> 21	
	<211> 101	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> CEBADOR	
	<400> 21	
35	ggtaaaaaat ttaaaaagtg ctgcgcccaa taatggtga cggtacggtt tagcaaacac	60
	tctcaacaag gttttccag ctgtaggctg gagctgctc g	101
	<210> 22	
	<211> 101	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> CEBADOR	
45	<400> 22	
	ggttgcgtaa tttcatccg taacggatta aaggaacca gttattttg ctggcgatta	60
	aagaataatc gttcgattac ccatatgaat atcctccta g	101
	<210> 23	
50	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> CEBADOR	
	<400> 23	
	ggaatgcaat cgtagccaca tcgc	24
60	<210> 24	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> CEBADOR	

	<400> 24 gcggattcgt tggaagttc aggg	24
5	<210> 25 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> CEBADOR	
15	<400> 25 tgctctagag tccgcgctgt gcaaattccag aatgg	35
20	<210> 26 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> CEBADOR	
25	<400> 26 ccaagctta actctctaca acagaaataa aaac	34
30	<210> 27 <211> 31 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> CEBADOR	
35	<400> 27 ctagtctaga ttagtacagc agacgggccc g	31
40	<210> 28 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> CEBADOR	
50	<400> 28 tccccggga agctccgctc agggcgtggt gaccg	35
55	<210> 29 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> CEBADOR	
60	<400> 29 atgcgcatgc ccacccttg aaaattgag ac	32
65	<210> 30 <211> 73 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> CEBADOR	

ES 2 600 036 T3

	<400> 30	
	gcatgctgac atcccggggc agaaaggccc acccgaaggt gagccagtgt gattactct	60
	gattcaggct gcc	73
5	<210> 31	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> CEBADOR	
	<400> 31	
15	tcacggatc catcaagctt gaaagaatgt gatgaatg	39
	<210> 32	
	<211> 45	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> CEBADOR	
	<400> 32	
25	atctagtaag cttagtaat tcgttacgac agattgatg gcgcg	45
	<210> 33	
	<211> 39	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> CEBADOR	
35	<400> 33	
	atgctgctaaa gcttggttat tagcgaatag acaaatcgg	39
	<210> 34	
40	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> CEBADOR	
	<400> 34	
	gcatgatcga attctgcaga cgtaaaaaa gcggcgtgg	39
50	<210> 35	
	<211> 115	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> CEBADOR	
	<400> 35	
60	ggctctgatt cagggcatcc cgctggctgg cgtgaaaaa gctcataata tacctcctcg	60
	tcaacaatat ctactcgag ataactccac ctattccaca cattatacga gccgg	115
	<210> 36	
	<211> 136	
	<212> ADN	
65	<213> Artificial	

ES 2 600 036 T3

	<220>	
	<223> CEBADOR	
	<400> 36	
5	ccttcatctt tacatctgga cgtctaaacg gatagatgtg cacaacacaa catataacta	60
	caagcgattg atgaggttaag gttcacactg gctcaccttc gggggggcct ttctgccata	120
	tgaatctct ccttag	136
	<210> 37	
10	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> CEBADOR	
	<400> 37	
	gcccggctact catgttttcg ggtttatgg	29
20	<210> 38	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> CEBADOR	
	<400> 38	
30	ccgttattcc agtagtcgcg tgcaatgg	28

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de metionina y su derivado la N-acetil metionina, en un proceso fermentativo que comprende las etapas siguientes:
- 5
- cultivar un microorganismo modificado en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y una fuente de azufre, y
 - recuperar la metionina del medio de cultivo,
- 10
- en el que, comparado con un microorganismo no modificado, el microorganismo modificado presenta una desformilación disminuida de formil-THF, que se obtiene por eliminación del gen *purU*, y
- en el que el microorganismo modificado es limitado en o privado de fosfato en el medio de cultivo.
- 15
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es modificado además mediante un consumo reducido de PEP, que se obtiene mediante la eliminación del gen *pykA*, o del gen *pykF*, o ambos genes.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que es aumentada en el microorganismo modificado la expresión de por lo menos uno de los genes siguientes: *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *cysE*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *glyA*.
- 20
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que es aumentada en el microorganismo la expresión de los operones *cysPUWAM* y/o *cysJIH*.
- 25
5. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que es aumentada en el microorganismo la expresión del complejo de escisión de la glicina codificado por los genes *gcvTHP* y/o *lpd*.
6. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que es sobreexpresado por lo menos un gen implicado en la vía de biosíntesis de la glicina tal como *serA*, *serB*, *serC* o *glyA*.
- 30
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que por lo menos uno de los genes siguientes está sobreexpresado en el microorganismo modificado: *metF*, alelos de *metA* que codifican enzimas con una sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina, *thrA* o alelos de *thrA* con una inhibición de retroalimentación reducida a treonina, *cysE*, *metH*.
- 35
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el gen *metJ* que codifica el represor de metionina es eliminado en el microorganismo.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la fuente de azufre en el medio de cultivo es seleccionada de entre sulfato, tiosulfato, sulfuro de hidrógeno, ditionato, ditionita, sulfito o una combinación de las diferentes fuentes.
- 40
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la fuente de carbono es la glucosa o la sacarosa.
- 45
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el derivado de metionina, la N-acetilmetionina, es transformada en metionina por desacilación, antes de que la metionina sea recuperada.
- 50
12. Microorganismo que comprende las modificaciones siguientes:
- la eliminación del gen *purU*; y
 - la sobreexpresión de los alelos de *metA* que codifican las enzimas con una sensibilidad de retroalimentación reducida a la S-adenosilmetionina y/o la metionina.
- 55
13. Microorganismo según la reivindicación 12, que comprende además las modificaciones según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.

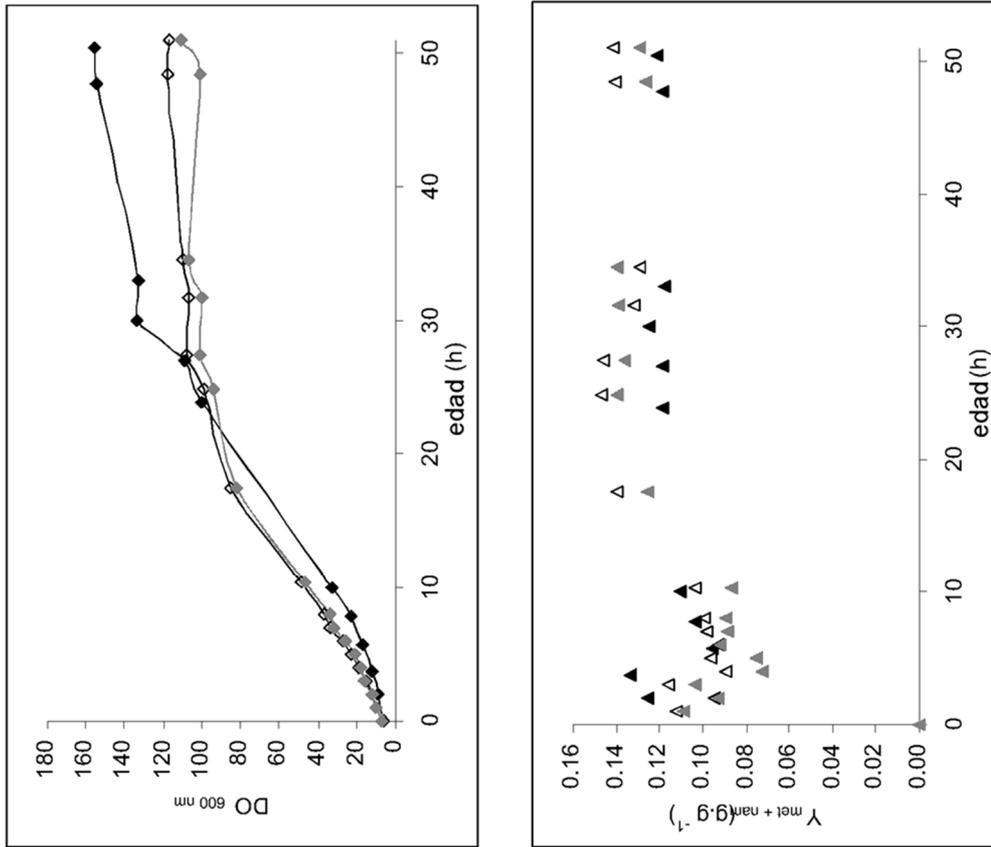


FIG. 2