

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 170**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2012 PCT/IB2012/001336**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13190343**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2012 E 12738603 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2861726**

54 Título: **Microorganismo recombinante para la producción fermentativa de metionina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.09.2017

73 Titular/es:
**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Straße 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:
**DISCHERT, WANDA y
FIGGE, RAINER**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 632 170 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

Microorganismo recombinante para la producción fermentativa de metionina

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a un microorganismo recombinante para la producción de metionina y a un método para producir metionina, al cultivar el microorganismo recombinante en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y una fuente de azufre. El microorganismo se modifica de modo que el rendimiento de metionina/fuente de carbono se incremente al atenuar la actividad de la metionina sintasa dependiente de cobalamina. En particular, el gen *metE* se elimina en el microorganismo recombinante.

10 Técnica anterior

Compuestos que contienen azufre tales como cisteína, homocisteína, metionina o S-adenosilmetionina son críticos para el metabolismo celular y se producen industrialmente para ser usados como aditivos de alimentos y piensos y productos farmacéuticos. En particular la metionina, un aminoácido esencial, que no puede ser sintetizada por los animales, representa un papel importante en muchas funciones corporales. Aparte de su papel en la biosíntesis de proteínas, la metionina está implicada en la transmetilación y en la biodisponibilidad de selenio y cinc. La metionina también se usa directamente para trastornos como alergia y fiebre reumática. No obstante, la mayoría de la metionina que se produce se añade a piensos.

20 Con la reducción del uso de proteínas derivadas de animales como resultado de BSE y la gripe aviar, se ha incrementado la demanda de metionina pura. Comúnmente, la D,L-metionina se produce químicamente a partir de acroleína, metilmercaptano y cianuro de hidrógeno. Sin embargo, la mezcla racémica no se comporta tan bien como la L-metionina pura (Saunderson, 1985). Adicionalmente, aunque se puede producir L-metionina pura a partir de metionina racémica, por ejemplo, a través del tratamiento con acilasa de N-acetil-D,L-metionina, esto incrementa drásticamente los costes de producción. Según esto, la demanda creciente de L-metionina pura asociada a los problemas medioambientales hacen a la producción microbiana de metionina una perspectiva atractiva. Optimizar la producción de un producto químico procedente de un microorganismo implica típicamente sobreexpresar proteínas implicadas en la ruta biosintética, atenuar proteínas implicadas en la represión de la ruta biosintética o atenuar proteínas implicadas en la producción de subproductos no deseables. Todos estos enfoques para la optimización de la producción de L-metionina en microorganismos se han descrito previamente (véanse, por ejemplo, Kumar y cols., 2005 y las patentes o solicitudes de patente US 7.790.424, US 7.611.873, WO 2002/010209, WO 2005/059093, WO 2006/008097 y WO 2012/055798); sin embargo, la producción industrial de L-metionina a partir de microorganismos requiere mejoras adicionales.

35 En *Escherichia coli* y en otros microorganismos como *Corynebacterium glutamicum*, dos enzimas distintas catalizan la etapa final de la biosíntesis *de novo* de metionina (Foster y cols., 1961; González y cols., 1992). La metionina sintasa dependiente de cobalamina (MetH, EC 2.1.1.13) es codificada por el gen *metH* y contiene un grupo prostético que es requerido para la actividad. La metionina sintasa independiente de cobalamina (MetE, EC 2.1.1.14) es codificada por el gen *metE* y no tiene un requerimiento conocido de un grupo prostético derivado de vitamina. Numerosas solicitudes de patente están relacionadas con la sobreproducción de enzimas MetH y MetE para potenciar la última etapa de la biosíntesis de metionina, como por ejemplo:

Los documentos WO2007/012078 y WO2007/135188 de BASF describen alteraciones genéticas que conducen a la sobreexpresión de los genes *metH* y/o *metE*.

45 El documento WO2009/144270 de EVONIK describe un método para producir metionina con un microorganismo que presenta un incremento de la cantidad y/o actividad de un sistema de reactivación de MetH dependiente de cob(l)alamina.

La atenuación de la actividad enzimática de MetE también se ha descrito previamente. Chu y cols., 1985 y Hondorp y Matthews, 2009 describen alteraciones genéticas en cepas de *E. coli* que conducen a la atenuación. Sin embargo, Chu y cols. presenta solamente la clonación y la expresión del gen *metE* y un mutante del mismo, mientras que Hondorp y Matthews meramente evalúa los efectos de la atenuación sobre el crecimiento bacteriano es condiciones de estrés de disulfuro específicas.

50 Los inventores han encontrado, sorprendentemente e inesperadamente, que una atenuación de la cantidad y/o actividad de la metionina sintasa independiente de cobalamina (MetE) conduce a una mejora en la producción de metionina. Esta es la primera vez que la pérdida de actividad de una de las enzimas pertenecientes a la ruta de biosíntesis de metionina se propone como beneficiosa para la producción de metionina.

La divulgación se refiere a un microorganismo recombinante optimizado para la producción de metionina, en donde se atenúa la actividad de la metionina sintasa independiente de cobalamina MetE. Preferiblemente, el gen *metE* que codifica la enzima MetE se elimina o se muta. El microorganismo recombinante también puede comprender otras modificaciones genéticas tales como:

- 5 un incremento en la expresión de al menos uno de los siguientes genes: *ptsG*, *pyc*, *pntAB*, *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysl*, *cysH*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *metF*, *metH*, *thrA*, alelo *metA* que codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina (*metA**), *thrA* o un alelo *thrA* que codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina (*thrA**) y/o
- 10 una expresión atenuada de uno de los siguientes genes: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *ybdL* o *yncA*. En una realización particular, la presente invención se refiere a un microorganismo en el que: a) el gen *metE* se elimina, y b) la expresión de los genes *metA**, *metH*, *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP*, *metF*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *thrA** y *pyc* se potencia; y c) la expresión de los genes *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU* and *yncA* se atenúa.
- 15 La divulgación también se refiere a un método para la producción de metionina o derivados de metionina en un procedimiento fermentativo que comprende las etapas de: a) cultivar el microorganismo recombinante según la invención en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono fermentable que contiene glucosa y una fuente de azufre y b) recuperar metionina o derivados de metionina del medio de cultivo.

Sumario de la invención

- 20 La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 11.

Descripción detallada de la invención

- 25 Antes de describir la presente invención con detalle, se debe entender que esta invención no se limita a métodos particularmente ejemplificados y, por supuesto, puede variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir realizaciones particulares de la invención solamente, y no pretende ser limitativa, que estarán limitadas solamente por las reivindicaciones adjuntas.

- 30 Por otra parte, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas microbiológicas y de biología molecular dentro de la especialidad. Tales técnicas son muy conocidas por el trabajador experto y se explican a fondo en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Prescott y cols. (1999) y Sambrook y cols. (1989) (2001).

- 35 Se debe apuntar que según se usa en la presente u y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, una referencia a "un microorganismo" incluye una pluralidad de estos microorganismos, y una referencia a "un gen endógeno" es una referencia a uno o más genes endógenos, etc. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por un experto normal en la especialidad a la que pertenece la invención. Los materiales y métodos preferidos se describen ahora.

- 40 En las reivindicaciones que siguen y en la descripción consecutiva de la invención, excepto cuando el contexto requiera otra cosa debido al lenguaje expresado o la implicación necesaria, la palabra "comprenden", "contienen", "implican" o "incluyen" o variaciones tales como "comprende", "que comprende", "que contiene", "implicado", "incluye", "que incluye" se usan en un sentido inclusivo, es decir para especificar la presencia de unas características indicadas pero no excluir la presencia o la adición de características adicionales en diversas realizaciones de la invención.

Definiciones

- El término "metionina" indica el aminoácido esencial que contiene azufre con la fórmula química $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ y número CAS 59-51-8 o 63-68-3 para el isómero L específico.

- 50 "Derivados de metionina" se refiere a análogos moleculares de metionina que presentan el mismo esqueleto químico pero difieren de la metionina con al menos un grupo químico. Según se divulga en la presente, derivados de metionina preferidos son N-acetilmetionina (NAM), S-adenosilmetionina (SAM) e hidroximetionina.

- 55 El término "microorganismo", según se usa en la presente, se refiere a una bacteria, una levadura o un hongo que no está modificado artificialmente. Preferentemente, el microorganismo se selecciona entre *Enterobacteriaceae*,

Bacillaceae, Streptomycetaceae y Corynebacteriaceae. Más preferentemente, el microorganismo es una especie de *Escherichia, Klebsiella, Pantoea, Salmonella o Corynebacterium*. Aún más preferentemente, el microorganismo es la especie bien *Escherichia coli* o bien *Corynebacterium glutamicum*.

5 El término "microorganismo recombinante" o "microorganismo modificado genéticamente", según se usa en la presente, se refiere a una bacteria, una levadura o un hongo que no se encuentre en la naturaleza y sea genéticamente diferente de su equivalente encontrado en la naturaleza. Significa que está modificado bien mediante la introducción o bien mediante la eliminación o bien mediante la modificación de elementos genéticos. También se puede transformar al forzar el desarrollo y la evolución de nuevas rutas metabólicas al combinar mutagénesis dirigida y evolución bajo una presión de selección específica (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/076659).

10 Un microorganismo se puede modificar para expresar genes exógenos si estos genes se introducen en el microorganismo con todos los elementos que permitan su expresión en el microorganismo hospedador. La modificación o "transformación" de microorganismos con ADN exógeno es una tarea habitual para los expertos en la especialidad.

15 Un microorganismo se puede modificar para modular el nivel de expresión de un gen endógeno.

20 El término "gen endógeno" significa que el gen estaba presente en el microorganismo antes de cualquier modificación genética, en la cepa silvestre. Los genes endógenos se pueden sobreexpresar al introducir secuencias heterólogas además de, o para reemplazar, elementos reguladores endógenos, o al introducir una o más copias suplementarias del gene en el cromosoma o un plásmido. Los genes endógenos también se pueden modificar para modular su expresión y/o actividad. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones en la secuencia codificante para modificar el producto génico o se pueden introducir secuencias heterólogas además de o para reemplazar elementos reguladores endógenos. La modulación de un gen endógeno puede dar como resultado la regulación al alza y/o la potenciación de la actividad del producto génico o, alternativamente, la regulación a la baja y/o la disminución de la actividad del producto génico endógeno.

25 Otro modo de modular su expresión es cambiar el promotor endógeno de un gen (p. ej., promotor silvestre) con un promotor más fuerte o más débil para regular al alza o a la baja la expresión del gen endógeno. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos. Está totalmente dentro de la capacidad del experto en la especialidad seleccionar los promotores apropiados.

30 El término "gen exógeno" significa que el gen se introducía en un microorganismo, por medios muy conocidos por el experto en la especialidad, aunque este gen no estuviera presente naturalmente en el microorganismo. Los genes exógenos pueden integrarse en el cromosoma hospedador, o expresarse extracromosómicamente por plásmidos o vectores. Es muy conocida en la especialidad una variedad de plásmidos, que difieren con respecto a su origen de replicación y su número de copias en la célula. Estos genes pueden ser heterólogos u homólogos.

35 El término "gen heterólogo" significa que el gen se deriva de una especie de microorganismo diferente del microorganismo receptor que lo expresa. Se refiere a un gen que no está presente naturalmente en el microorganismo.

40 En la presente solicitud, todos los genes se mencionan con sus nombres comunes a partir de *E. coli*. Sus secuencias nucleotídicas están disponibles en los ciber sitios <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> o <http://www.ebi.ac.uk/embl/>.

45 Usando las referencias dadas en Genbank para genes conocidos, los expertos en la especialidad son capaces de determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo habitual se realiza ventajosamente usando secuencias de consenso que se pueden determinar al llevar a cabo alineamientos de secuencias con genes derivados de otros microorganismos y diseñando sondas degeneradas para clonar el gen correspondiente en otro organismo. Estos métodos habituales de biología molecular son muy conocidos por los expertos en la especialidad y se reivindican, por ejemplo, en Sambrook y cols., (1989) y (2001).

50 Los términos "producción de metionina mejorada", "mejorar la producción de metionina" y equivalentes gramaticales de los mismos, según se usan en la presente, se refieren a un rendimiento incrementado de metionina/fuente de carbono (relación de gramo/mol de metionina producido por gramo/mol de fuente de carbono consumida que se puede expresar en porcentaje). Métodos para determinar la cantidad de fuente de carbono consumida y de metionina producida son muy conocidos por los expertos en la especialidad. El rendimiento es superior en el microorganismo recombinante en comparación con el correspondiente microorganismo no modificado.

55 Los términos "microorganismo optimizado para la producción fermentativa de metionina" se refiere a microorganismos evolucionados y/o genéticamente modificados para presentar una producción de metionina mejorada en comparación con la producción endógena de los correspondientes microorganismos silvestres. Estos microorganismos "optimizados" para la producción de metionina son muy conocidos en la especialidad, y se han

divulgado en particular en Kumar y cols., 2005 y en las solicitudes de patente WO2005/111202, WO2007/077041, WO2009/043803 y WO2012/055798.

5 Según la invención, los términos "producción fermentativa", "cultivo" o "fermentación" se usan para indicar el crecimiento de bacterias. Este crecimiento se efectúa generalmente en fermentadores con un medio de cultivo apropiado adaptado al microorganismo que se use y que contiene al menos una fuente de carbono simple, y si es necesario cosustratos.

10 Un "medio de cultivo apropiado" indica un medio (p. ej., un medio líquido estéril) que comprende nutrientes esenciales o beneficiosos para el mantenimiento y/o el crecimiento de la célula tal como fuentes de carbono o sustratos carbonados, fuentes de nitrógeno, por ejemplo, peptona, extractos de levadura, extractos de carne, extractos de malta, urea, sulfato amónico, cloruro amónico, nitrato amónico y fosfato amónico; fuentes de fósforo, por ejemplo, fosfato monopotásico o fosfato dipotásico; elementos vestigiales (p. ej., sales metálicas), por ejemplo sales de magnesio, sales de cobalto y/o sales de manganeso; así como factores de crecimiento tales como aminoácidos y vitaminas.

15 El término "fuente de carbono" o "sustrato carbonado", según la presente invención, indica cualquier fuente de carbono que pueda ser usada por los expertos en la especialidad para soportar el crecimiento normal de un microorganismo, incluyendo monosacáridos (tales como glucosa, galactosa, xilosa, fructosa o lactosa), oligosacáridos, disacáridos (tales como sacarosa, celobiosa o maltosa), melazas, almidón y sus derivados, hemicelulosas y combinaciones de los mismos. Una fuente de carbono simple especialmente preferida es la glucosa. Otra fuente de carbono simple preferida es la sacarosa. La fuente de carbono se puede derivar de material renovable. Un material renovable se define como una materia prima requerida para ciertos procedimientos industriales que se puede regenerar en un breve espacio y en una cantidad suficiente para permitir su transformación en el producto deseado. La biomasa vegetal, tratada o no, es una fuente de carbono renovable interesante.

20 El término "fuente de azufre" según la invención se refiere a sulfato, tiosulfato, sulfuro de hidrógeno, ditionato, ditionito, sulfito, metilmercaptano, sulfuro de dimetilo y otros sulfuros terminados en metilo o una combinación de las diferentes fuentes. Más preferentemente, la fuente de azufre en el medio de cultivo es sulfato o tiosulfato o una mezcla de los mismos.

25 Los términos "fuente de nitrógeno" corresponde bien a una sal amónica o bien a amoniaco gaseoso. La fuente de nitrógeno se suministra en la forma de amonio o amoniaco.

30 Los términos "atenuación" o "expresión atenuada" significan en este contexto que la expresión de un gen o una enzima está reducida o suprimida en comparación con un microorganismo no modificado. La reducción o supresión de la expresión de una enzima se obtiene mediante la atenuación de la expresión del gen que codifica dicha enzima.

35 La atenuación de genes se puede conseguir por medios y métodos conocidos para el experto en la especialidad. Generalmente, la atenuación de la expresión génica que puede conseguir al:

Mutar la región codificante o la región promotora o

Eliminar la totalidad o parte de la región promotora necesaria para la expresión génica o

Eliminar la región codificante del gen mediante recombinación homóloga o

40 Insertar un elemento externo en la región codificante o en la región promotora o

Expresar el gen bajo el control de un promotor débil.

El experto en la especialidad conoce una variedad de promotores que exhiben diferente fuerza y un promotor que se usa para una expresión genética débil.

50 El término "actividad" de una enzima se usa intercambiamente con el término "función" e indica, en el contexto de la invención, la reacción que es catalizada por la enzima. El experto en la especialidad sabe cómo medir la actividad enzimática de dicha enzima. En particular, para medir la actividad de la proteína MetE, véase el ejemplo 5.

55 Los términos "actividad atenuada" o "actividad reducida" de una enzima significan bien una actividad catalítica específica reducida de la proteína obtenida mediante mutación en la secuencia de aminoácidos y/o concentraciones disminuidas de la proteína en la célula obtenida mediante la mutación de la secuencia nucleotídica o mediante la eliminación de la región codificante del gen.

Los términos "actividad potenciada" o "actividad incrementada" de una enzima indica bien una actividad catalítica específica incrementada de la enzima y/o bien una cantidad/disponibilidad incrementada de la enzima en la célula, obtenida, por ejemplo, al sobreexpresar el gen que codifica la enzima.

5 Los términos "expresión incrementada", "expresión potenciada" o "sobreexpresión" y equivalentes gramaticales de los mismos se usan intercambiamente en el texto y tienen un significado similar. Estos términos significan que la expresión de un gen o una enzima se incrementa en comparación con un microorganismo no modificado. La expresión incremente de una enzima se obtiene al incrementar la expresión del gen que codifica dicha enzima.

10 Para incrementar la expresión de un gen, el experto en la especialidad conoce diferentes técnicas:

Incrementar el número de copias del gen en el microorganismo. El gen se codifica cromosómicamente o extracromosómicamente. Cuando el gen está situado sobre el cromosoma, varias copias del gen se pueden introducir en el cromosoma mediante métodos de recombinación, conocidos por el experto en el campo (incluyendo la sustitución de genes). Cuando el gen está situado extracromosómicamente, puede ser soportado por diferentes tipos de plásmidos que difieren con respecto a su origen de replicación y así su número de copias en la célula. Estos plásmidos están presentes en el microorganismo en de 1 a 5 copias, o aproximadamente 20 copias, o hasta 500 copias, dependiendo de la naturaleza del plásmido: plásmidos de bajo número de copias con replicación estrecha (pSC101, RK2), plásmidos de bajo número de copias (pACYC, pRSF1010) o plásmidos de alto número de copias (pSK bluescript II).

20 Usar un promotor que induzca un alto nivel de expresión del gen. El experto en la especialidad sabe qué promotores son los más convenientes, por ejemplo se usan ampliamente los promotores *P_{trc}*, *P_{tac}*, *P_{lac}*, o el promotor *lambda cl*. Estos promotores pueden ser "inducibles" por un compuesto particular o por una condición externa específica como la temperatura o la luz. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos.

Atenuar la actividad o la expresión de un represor de la transcripción, específico o no específico del gen.

25 Usar elementos que establezcan el correspondiente ARN mensajero (Carrier y Keasling, 1998) o elementos que establezcan la proteína (p. ej., marcadores GST, GE Healthcare).

El término "codificación" se refiere al proceso por el que un polinucleótido, a través de los mecanismos de transcripción y traducción, produce una secuencia de aminoácidos. El gen o los genes que codifican la enzima o las enzimas pueden ser exógenos o endógenos.

30 Los términos "sensibilidad de retroalimentación" o "inhibición de la retroalimentación" se refieren a un control del mecanismo celular en el que una o varias enzimas que catalizan la producción de una sustancia particular en la célula son inhibidas o menos activas cuando esa sustancia se ha acumulado hasta un cierto nivel. Así, los términos "sensibilidad de retroalimentación reducida" o "inhibición de retroalimentación reducida" significan que la actividad de tal mecanismo se disminuye o suprime en comparación con un microorganismo no modificado. El experto en la especialidad sabe cómo modificar la enzima para obtener este resultado. Estas modificaciones se han descrito en la solicitud de patente WO 2005/111202 o en la patente US 7.611.873.

40 La divulgación se refiere a un microorganismo recombinante optimizado para la producción fermentativa de metionina, en donde se atenúa la actividad de la metionina sintasa independiente de cobalamina *MetE*.

45 El experto en la especialidad conoce muchos medios y métodos para atenuar la actividad enzimática como mutación proteínica, mutación génica o atenuación de la expresión génica. La mutación proteínica se puede conseguir al reemplazar aminoácidos específicos presentes en el sitio catalítico de la enzima, o introducir aminoácidos adicionales, o eliminar ciertos aminoácidos.

En un aspecto de la divulgación, se atenúa la expresión del gen *metE*, que codifica la metionina sintasa independiente de cobalamina *MetE*. La secuencia nucleotídica del gen *metE* de *E. coli* se muestra en SEQ ID N° 20.

50 La atenuación génica se puede conseguir al introducir ADN extraño en el gen para inactivarlo o al expresar el gen bajo el control de un promotor débil o un promotor inducible. El experto en la especialidad conoce una amplia variedad de promotores que exhiben diferente intensidad de expresión y/o diferentes parámetros de inducción y cómo modificar un promotor para disminuir su intensidad de expresión al modificar el promotor silvestre, a modo de ejemplo, en su secuencia de consenso, el sitio de unión al ribosoma o el codón de inicio... Así, el experto en la especialidad es capaz de elegir un promotor que conduce a una expresión atenuada de *metE*.

55 En una realización preferida de la invención, se elimina al menos una porción del gen *metE*. Preferiblemente, esta porción eliminada representa al menos 10% de la secuencia codificante, más preferiblemente al menos 20%, 30%, 40% o 50% de la secuencia codificante. Más preferiblemente, se elimina al menos 80% de la secuencia codificante.

En un ejemplo particular, el gen *metE* se elimina completamente. El experto en la especialidad conoce muchas técnicas para eliminar porciones génicas tales como recombinación homóloga.

5 En otro aspecto de la divulgación, el gen *metE* se muta a fin de codificar una proteína modificada que exhibe actividad atenuada. Por ejemplo, la mutación en el gen *metE* conduce a la traducción de una proteína MetE truncada que es inactiva. Más preferiblemente, la mutación es una eliminación de una porción de 13 pares de bases (pb): de la base 417 a la 429 del gen de *E. coli* cuya secuencia nucleotídica se muestra en la SEQ ID N° 20, conduciendo a una mutación de variación del marco. Por consiguiente, se acorta la traducción de la proteína (un codón de terminación se introduce mediante la variación del marco) y da lugar a una proteína truncada de 152 aminoácidos
10 que se muestra en la SEQ ID N° 22) en lugar de 753 aminoácidos en la secuencia silvestre, según se muestra en la SEQ ID N° 21. Cualquier mutación equivalente que permita la introducción de un codón de TERMINACIÓN en un gen procedente de cualquier especie de microorganismo también es parte de la divulgación.

Optimización de la ruta de biosíntesis de metionina

15 El microorganismo recombinante según la invención se modifica para mejorar la producción de metionina. Genes implicados en la producción de metionina son muy conocidos en la especialidad, y comprenden genes implicados en la ruta de biosíntesis específica de metionina así como genes implicados en rutas que proporcionan precursores y genes implicados en rutas que consumen metionina.

20 La producción eficaz de metionina requiere la optimización de la ruta específica de metionina y varias rutas que proporcionan precursores. Ya se han descrito cepas productoras de metionina, en particular en Kumar y cols. 2005 y en las solicitudes de patente WO2005/111202, WO2007/077041, WO2009/043803 y WO2012/055798.

25 En una realización específica de la invención, el microorganismo recombinante se modifica como se describe posteriormente: la expresión de *metH* es como se reivindica en la reivindicación 1 y, opcionalmente, al menos uno de los siguientes genes se incrementa: *ptsG*, *pyc*, *pntAB*, *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *metF*, *metA*, el alelo *thrA* que codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**), *thrA* y el alelo *thrA* que codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina (*thrA**).

· *ptsG* codifica la enzima PTS IICB^{Glc} según se describe en la solicitud de patente EP11305829.

30 · *pyc* codifica una piruvato carboxilasa según se describe en la solicitud de patente EP11305829. En una realización preferida, el gen *pyc* es heterólogos y se elige de los genes *pyc* de *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas fluoresceins* o especies de *Corynebacterium*,

· *pntAB* codifican subunidades de una transhidrogenasa unida a membrana, tal como se describe en la solicitud de patente WO2012/055798,

35 · *cysP* codifica una proteína de unión a sulfato periplásmica, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,

cysU codifica un componente de transportador ABC de sulfato, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,

40 *cysW* codifica una proteína de transporte de sulfato unido a membrana, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,

cysA codifica una sulfato permeasa, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,

cysM codifica una O-acetil serina sulfhidralasa, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,

45 *cysI* y *cysJ* codifican respectivamente las subunidades alfa y beta de una sulfito reductasa según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803. Preferiblemente, *cysI* y *cysJ* se sobreexpresan conjuntamente,

cysH codifica una adenililsulfato reductasa, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803.

Incrementar el metabolismo C1 también es una modificación que conduce a la producción de metionina mejorada. Se refiere al incremento de la actividad de al menos una enzima implicada en el metabolismo C1 elegida entre GcvTHP, Lpd, MetF o MetH. Por ejemplo, el metabolismo del carbono uno se incrementa al potenciar la expresión y/o la actividad de al menos uno de los siguientes:

· *gcvT*, *gcvH*, *gcvP* y *lpd*, que codifican el complejo de escisión de glicina, según se describe en la solicitud de patente WO 2007/077041. El complejo de escisión de glicina (GCV) es un complejo multienzimático que cataliza la oxidación de glicina, dando dióxido de carbono, amoníaco, metilén-THF y un nucleótido de piridina reducido. El complejo de GCV consiste en cuatro componentes proteínicos, la glicina deshidrogenasa dicha proteína P (GcvP), la lipoil-GcvH-proteína dicha proteína H (GcvH), la aminometiltransferasa dicha proteína T (GcvT) y la dihidrolipoamida deshidrogenasa dicha proteína L (GcvL o Lpd). La proteína P cataliza la liberación dependiente de fosfato de piridoxal de CO₂ de glicina, dejando un resto metilamina. El resto metilamina se transfiere al grupo ácido lipoico de la proteína H, que está unido a la proteína P antes de la descarboxilación de glicina. La proteína T cataliza la liberación de NH₃ del grupo metilamina y transfiere la unidad C1 restante al THF, formando metilén-THF. A continuación, la proteína L oxida el componente de ácido lipoico de la proteína H y transfiere los electrones a NAD⁺, formando NADH;

· *MetF* que codifica una metilentetrahidrofolato reductasa, según se describe en la solicitud de patente WO 2007/077041;

· *MetH* (homocisteína-N5-metiltetrahidrofolato transmetilasa dependiente de B12) que codifica metiltransferasas.

La sobreexpresión de al menos uno de los siguientes genes implicados en la biosíntesis de serina también reduce la producción del subproducto isoleucina:

· *serA* que codifica una fosfoglicerato deshidrogenasa, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,

· *serB* que codifica una fosfoserina fosfatasa, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,

· *serC* que codifica una fosfoserina aminotransferasa, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803.

Ya se ha mostrado que la sobreexpresión de los siguientes genes mejora la producción de metionina:

· *cysE* codifica una serina aciltransferasa; su sobreexpresión permite un incremento en la producción de metionina, según se describe en el documento WO 2007/077041;

· *metA* codifica una homoserina succiniltransferasa. El alelo MetA* codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina. Preferentemente, se usa el alelo MetA* descrito en la solicitud de patente WO 2005/111202;

· *thrA* codifica una aspartocinasa/homoserina deshidrogenasa; el alelo *thrA** codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina, según se describe en el documento WO 2005/111202.

En una realización específica de la invención, los genes pueden estar bajo el control de un promotor inducible. Por ejemplo, al menos uno de estos genes está bajo el control de un promotor inducible por la temperatura. Preferiblemente, la expresión de al menos uno de los genes: *thrA*, *cysE*, *metA* está bajo el control de un promotor inducible, directamente o indirectamente. Más preferiblemente, los genes *thrA*, *cysE* y *metA* están bajo el control de un promotor inducible, directamente o indirectamente. Como un primer ejemplo, la expresión del gen *thrA* está bajo el control directo de un promotor inducible y la expresión del gen *cysE* está bajo el efecto polar de la expresión inducible del gen *thrA*. Como un segundo ejemplo, la expresión del gen *thrA* está bajo el control directo de un promotor inducible y las expresiones de los genes *cysE* y *metA* están bajo el efecto polar de la expresión inducible del gen *thrA*.

Como un ejemplo adicional, el promotor inducible por la temperatura pertenece a la familia de promotores P_R. Una cepa productora de metionina que tiene genes bajo el control de promotores inducibles se describe en la solicitud de patente WO2011/073122.

En otra realización específica de la invención, el microorganismo se ha modificado adicionalmente, y la expresión de al menos uno de los siguientes genes se atenúa: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *ybdL* o *yncA*.

· el gen *metJ* codifica la proteína represora MetJ (GenBank 1790373), responsable de la regulación a la baja del regulón de metionina según se sugería en la solicitud de patente JP 2000/157267,

5 · Los genes *pykA* y *pykF* codifican las enzimas 'piruvato cinasa'. La atenuación de la expresión de al menos una o ambas de las piruvato cinasas disminuye el consumo de piruvato de fosfoenol (PEP). La disponibilidad incrementada de PEP puede incrementar la producción de oxaloacetato, un importante precursor de aspartato, que a su vez es un precursor de metionina, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,

10 · *purU* codifica una formiltetrahidrofolato desformilasa, una enzima que cataliza la reacción de formil-THF desformilasa. La atenuación de la actividad de desformilasa incrementa la producción de metil-THF que se requiera para la metilación de homocisteína. La pérdida de metabolitos C1 por desformilación conduce a un incremento en la producción de homocisteína que no se puede transformar en metionina. A continuación, la homocisteína puede ser un sustrato para la enzima cistationa gamma sintasa (MetB) que puede catalizar la
15 reacción entre O-succinilhomoserina y homocisteína dando como resultado la producción de homolantionina, según se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,

· *ybdL* codifica una aminotransferasa según se describe en la solicitud de patente PCT/FR2010/052937,

· *yncA* codifica una N-aciltransferasa, según se describe en la solicitud de patente WO 2010/020681.

20 Por ejemplo, la producción fermentativa de metionina por un microorganismo recombinante, en la que se atenúa la actividad de la metionina sintasa independiente de cobalamina MetE, a partir de glucosa como una fuente de carbono principal, se puede alcanzar a través de una combinación de las modificaciones analizadas anteriormente en dicho microorganismo, por ejemplo:

► la expresión del gen *metJ* se atenúa y la expresión de un alelo *metA* que codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**) se potencia;

25 ► la expresión del gen *metJ* se atenúa; la expresión de un alelo *metA* que codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**) se potencia; y la expresión de un alelo *thrA* que codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina (*thrA**) se potencia;

30 ► la expresión del gen *metJ* se atenúa; la expresión de un alelo *metA* que codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**) se potencia; la expresión de un alelo *thrA* que codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina (*thrA**) se potencia; y la expresión del gen *cysE* se potencia;

35 ► la expresión del gen *metJ* se atenúa; la expresión de un alelo *metA* que codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**) se potencia; la expresión de un alelo *thrA* que codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina (*thrA**) se potencia; la expresión del gen *cysE* se potencia; y la expresión de los genes *metF* y/o *metH* se potencia.

En un aspecto particular de la invención, el microorganismo recombinante comprende las siguientes modificaciones genéticas:

40 · el gen *metE* se elimina,

· la expresión de los genes *metA**, *metH*, *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP*, *metF*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *thrA** y *pyc* se potencian, y

· los genes *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU* y *yncA* se atenúan.

45 En una realización particular de la invención, el microorganismo es de la familia bacteriana *Enterobacteriaceae* o *Corynebacteriaceae*.

Preferentemente, el microorganismo es *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum*.

Condiciones de cultivo

La invención también se refiere a un método de producción de metionina que comprende las siguientes etapas:

- 5 - Cultivar un microorganismo recombinante en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono fermentable y una fuente de azufre, y
- Recuperar metionina o sus derivados del medio de cultivo.

10 Los expertos en la especialidad son capaces de definir las condiciones de cultivo para los microorganismos según la invención. En particular, las bacterias se fermentan a una temperatura entre 20°C y 55°C, preferentemente entre 25°C y 40°C, y más específicamente aproximadamente 30°C para *C. glutamicum* y aproximadamente 37°C para *E. coli*.

15 Para *E. coli*, el medio de cultivo puede ser de composición idéntica o similar a un medio M9 (Anderson, 1946), un medio M63 (Miller, 1992); o un medio tal como el definido por Schaefer y cols., (1999).

Para *C. glutamicum*, el medio de cultivo puede ser de composición idéntica o similar a medio BMCG (Liebl y cols., 1989) o a un medio tal como el descrito por Riedel y cols., (2001).

20 En alguna realización de la invención, el cultivo se somete a una limitación o privación para uno o varios sustratos inorgánicos. Se refiere a una condición bajo la que el crecimiento de los microorganismos está gobernado por la cantidad de un producto químico inorgánico suministrado que todavía permita un crecimiento débil. Esta limitación en el crecimiento de microorganismos se ha descrito en la solicitud de patente WO 2009/043372. En una realización preferida de la invención, el cultivo se somete a limitación de fosfato.

25 La acción de "recuperar metionina o sus derivados del medio de cultivo" indica la acción de recuperar L-metionina y/o uno de sus derivados, en particular N-acetilmetionina (NAM) y S-adenosilmetionina (SAM) y todos los otros derivados que puedan ser útiles. Los métodos para la recuperación y la purificación de los compuestos producidos son muy conocidos por los expertos en la especialidad (véanse, en particular, WO 2005/007862, WO 2005/059155).

30 La cantidad de producto en el medio de fermentación se puede determinar usando un número de métodos conocidos en la especialidad, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC). Por ejemplo, la cantidad de metionina obtenida en el medio se mide mediante HPLC después de derivación con OPA/Fmoc usando L-metionina (Fluka, Ref 64319) como un patrón. La cantidad de NAM se determina usando HPLC refractométrica usando NAM (Sigma, Ref 01310) como un patrón.

35 Ejemplos

La presente divulgación se define adicionalmente en los siguientes ejemplos. Se debe entender que estos ejemplos, aunque indiquen realizaciones preferidas de la invención, se dan solamente a modo de ilustración. A partir de la divulgación anterior y estos ejemplos, el experto en la especialidad puede hacer varios cambios de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones sin modificar los medios esenciales de la invención.

40 En particular, los ejemplos muestran cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) modificadas, pero estas modificaciones se pueden realizar fácilmente en otros microorganismos de la misma familia.

45 *Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que comprende miembros que son gramnegativos, con conformación de bacilo, no formadores de esporas y típicamente tienen 1-5 µm de longitud. La mayoría de los miembros tienen flagelos usados para moverse, pero unos pocos géneros son inmóviles. Muchos miembros de esta familia son una parte normal de la flora intestinal de los intestinos de seres humanos y otros animales, mientras que otros se encuentran en el agua o el suelo, o son parásitos de una variedad de diferentes animales y plantas. *E. coli* es uno de los más importantes organismos modélicos, pero otros miembros importantes de la familia *Enterobacteriaceae* incluyen *Klebsiella*, en particular *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola* o *Klebsiella oxytoca*, y *Salmonella*.

50 Por otra parte, varias solicitudes de patente apuntan a que la optimización para la producción de metionina se puede aplicar fácilmente en *E. coli* y en *Corynebacterium glutamicum* sin experimentación excesiva.

55

Ejemplo 1: Protocolos

Se han usado varios protocolos para construir cepas productoras de metionina descritas en los siguientes ejemplos.

5 Protocolo 1: Modificaciones cromosómicas mediante recombinación homóloga y selección de recombinantes (Datsenko, & Wanner, (2000)).

10 La sustitución alélica o la inserción génica en un locus cromosómico especificado se llevó a cabo mediante recombinación homóloga según se describe por Datsenko & Wanner (2000). La resistencia a kanamicina (Km) *kan*, flanqueada por sitios de reconocimiento F₁p, se amplificó mediante PCR al usar el plásmido pKD4 como plantilla. Los productos de PCR resultantes se usaron para transformar la cepa de *E. coli* receptora que aloja el plásmido pKD46 que expresa la recombinasa λ Red (γ, β, exo). A continuación, se seleccionaron transformantes resistentes a antibiótico y la estructura cromosómica del locus modificado se verificó mediante análisis de PCR con los cebadores apropiados listados en la Tabla 3.

15 El gen de resistencia *kan* se puede cortar usando el plásmido pCP20 que soporta el gen que codifica F₁p recombinasa según se describe por Datsenko & Wanner (2000). El plásmido pCP20 se introdujo en la cepa apropiada y los transformantes se extendieron sobre LB complementado con ampicilina a 30°C. A fin de expresar el gen *f₁p* y retirar el casete de kanamicina, los transformantes se cultivaron a 37°C. A continuación, después del aislamiento, los clones sensibles a antibiótico se verificaron mediante PCR usando los oligonucleótidos listados en la Tabla 3.

20 Protocolo 2: Transducción del fago P1

Las modificaciones cromosómicas se transfirieron a una cepa receptora de *E. coli* dada mediante transducción de PI. El protocolo incluye 2 etapas: (i) preparación del lisado fágico en una cepa donante que contiene la modificación cromosómica asociada con la resistencia y (ii) infección de la cepa receptora mediante este lisado fágico.

Preparación del lisado fágico

- 25
- Inocúlense 100 µl de un cultivo nocturno de la cepa MG1655 con la modificación cromosómica de interés en 10 ml de Km 50 µg/ml + glucosa 0,2% + CaCl₂ 5 mM.
 - Incúbese 30 min a 37°C con agitación.
 - Añádanse 100 µl de lisado del fago PI preparado en la cepa donante MG1655 (aprox. 1 x 10⁹ fagos/ml).
 - Agítese a 37°C durante 3 horas hasta la lisis completa de las células.
- 30
- Añádanse 200 µl de cloroformo, y sométase a turbulencia
 - Centrifúguese 10 min a 4.500 g para eliminar residuos celulares.
 - Transfírase el sobrenadante a un tubo estéril.
 - Almacénese el lisado a 4°C.

Transducción

- 35
- Centrifúguese 10 min a 1.500 g 5 ml de un cultivo nocturno de la cepa receptora de *E. coli* cultivada en medio LB.
 - Suspéndase la pella celular en 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM.
 - Inféctense 100 µl de células con 100 µl de fago PI de la cepa MG1655 con la modificación en el cromosoma (tubo de ensayo) y como a tubos de control 100 µl de células sin fago PI y 100 µl de fago P1 sin células.
- 40
- Incúbese 30 min a 30°C sin agitación.

- Añádanse 100 µl de citrato sódico 1 M en cada tubo y sométase a turbulencia.
 - Añádase 1 ml de LB.
 - Incúbese 1 hora a 37°C con agitación
 - Centrifúguese 3 min a 7.000 rpm.
- 5
- Siémbrese en placa sobre LB + Km 50 µg/ml
 - Incúbese a 37°C durante la noche.

Tabla 1: Cepas (número y genotipo) citadas o descritas en los siguientes ejemplos.

| Número de cepa | Genotipo |
|----------------|---|
| 1 | MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> Δ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>CP4</i> -6::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> |
| 2 | MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> Δ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>CP4</i> -6::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> Δ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> -TT07::Km |
| 3 | MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> Δ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>CP4</i> -6::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> Δ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> -TT07 |
| 4 | MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> Δ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>CP4</i> -6::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> Δ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> -TT07::Km (pCL1920- <i>PgapA</i> - <i>pycre</i> -TT07) |
| 5 | MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> Δ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>CP4</i> -6::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> Δ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> -TT07::Km (pCL1920- <i>PgapA</i> - <i>pycre</i> -TT07) (pCC1BAC-TT02- <i>Ptrc30</i> / <i>RBS01</i> - <i>serC</i> -TT07*2- <i>Ptrc30</i> / <i>RBS01</i> - <i>serA</i> -TTadcca) |
| 6 | MG1655 <i>metA</i> *11 <i>metE</i> ::Km <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> Δ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>CP4</i> -6::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> Δ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> -TT07 |
| 7 | MG1655 <i>metA</i> *11 <i>metE</i> ::Km <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> Δ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>CP4</i> -6::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 Δ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> Δ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> -TT07 (pCL1920- <i>PgapA</i> - <i>pycre</i> -TT07) (pCC1BAC-TT02- <i>Ptrc30</i> / <i>RBS01</i> - <i>serC</i> -TT07*2- <i>Ptrc30</i> / <i>RBS01</i> - <i>serA</i> -TTadcca) |

Tabla 2: Correspondencia ente la nomenclatura previa y la actual para el genotipo de la cepa 1 descrita en la solicitud de patente EP10306164.

| Nomenclatura previa | Nomenclatura actual |
|---|---|
| MG1655 <i>metA</i> *11 | MG1655 <i>metA</i> *11 |
| <i>Ptrc-meth</i> | <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>meth</i> |
| <i>PtrcF-cysPUWAM</i> | <i>Ptrc01-cysPUWAM</i> |
| <i>PtrcF-cysJIH</i> | <i>Ptrc01-cysJIH</i> |
| <i>Ptrc09-gcvTHP</i> | <i>Ptrc01/RBS01-gcvTHP</i> |
| <i>Ptrc36-ARNmst17-metF</i> | <i>Ptrc01/ARN01/RBS01-metF</i> |
| <i>Ptrc07-serB</i> | <i>Ptrc94-serB</i> |
| $\Delta metJ \Delta pykF \Delta pykA \Delta purU \Delta yncA$ | $\Delta metJ \Delta pykF \Delta pykA \Delta purU \Delta yncA$ |
| $\Delta malS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE$ | $\Delta malS::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/RBS01*4-thA*1-cysE$ |
| $\Delta pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ | $\Delta pgaABCD::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ |
| $\Delta uxaCA ::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ | $\Delta uxaCA::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ |
| $\Delta CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ | $\Delta CP4-6::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ |
| $\Delta wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ | $\Delta wcaM::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ |
| $\Delta treBC::TT02-serA-serC$ | $\Delta treBC::RN/serA-serC$ |

Tabla 3: Oligonucleótidos usados en los siguientes ejemplos.

| Nombre del oligonucleótido | SEQ ID N° | Secuencia 5' → 3' |
|------------------------------|-----------|---|
| Yjblup-F | 1 | cgtagggcgggtaccgagtgagatcggtggaaggcg |
| Yjblup-R | 2 | gcttgatatacaacagataaaacgaaaggccagctcttcgactgagcctttcgctttat ttgatgcatcttctgtagaattttacacttatagatcattactgattgagacttca |
| Yjblown-F | 3 | agactggcctttctgtttatctgtgtatacaagctttacataggcccttaattaata atgaataagggtgttaagtaaaaggaaaacatcaccgttctggtcgc |
| Yjblown-R | 4 | cgtagggcgggtaccagcataatcattcaccacacatccg |
| Km-F | 5 | tccccgggtataccatataatcctccttag |
| Km-R | 6 | gcccaagctttaggctggagctgctcg |
| <i>Ptrc01/RBS01-GcvTHP-F</i> | 7 | cgtaggcctgggcccagctgtgacaattaatcatccg |
| <i>GcvTHP-TT07-R</i> | 8 | cgaaggccttaattaagcagaaaggccaccggaaggtagccaggcggccg cttactggtattcgctaatcggtacg |
| yjbl-gcvTHP-F | 9 | cagaccaccaactggcgacc |
| yjbl-gcvTHP-R | 10 | gccattggaatcgaccagcc |
| <i>Ptrc30/RBS01-F</i> | 11 | tcggcgccttaattaacataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggct ttcgtttatctgtttacgtagagctgttgacgattaatcatccggctcgtatactgtgtg gaataaggaggtatatt |
| <i>Ptrc30/RBS01-serC-R</i> | 12 | ccagaactaaaattgaagattgagccataatatacctccttattccacacagtat acgagc |

| Nombre del oligonucleótido | SEQ ID N° | Secuencia 5' → 3' |
|----------------------------|-----------|---|
| serC-TT07*2-R | 13 | cccaagcttgatcgctgtagcgagctcgagaaaggcccaccggaaggtgagcca ggttaaccgtgacggcgttcg |
| Ptrc30/RBS01-serA-F | 14 | tacgtagctagcgagctgttgacgattaatcatccggctcgatactgtgtggaataa ggaggtatattatggcaagggtatcgctggagaaag |
| serA-TTadcca-R | 15 | cccaagcttgatgccctaggtaaaaaaaataagagttaccatttaaggttaactctta ttttattagtagcagcagacggcgcg |
| metE-Km-F | 16 | agaaaccgcgcggcactggcgaacatggtgcagggcgcgagaacttgcgtc gggggtaaaatccaaaccgggtgtaataaccaccggctctttctcatgtaggctg gagctgcttcg |
| metE-Km-R | 17 | gcagaagatggctggcagcgtatgctggaatggttaagcagtaggtggaaga agtcgctgtaagcagaaaggcccaccggaaggtgagccagtgacatatgaata tctccttag |
| metE-F | 18 | cgttgggactggatgtgctgg |
| metE-R | 19 | gcgtggtacggcaactgac |

Ejemplo 2: Construcción de la cepa 5, MG1655 *metA*11 Ptrc01*2/RBS08*1-metH Ptrc01-cysPUWAM Ptrc01-cysJIH Ptrc01/RBS01-gcvTHP Ptrc01/ARN01/RBS01-metF Ptrc94-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::RN/PRM-C1857-TTadcca-PR01/RBS01*4-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔtreBC::RN/serA-serC ΔyjbI::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km (pCL1920-PgapA-pycre-TT07) (pCC1BAC-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca)*

1. Cepas 1

10 La cepa productora de metionina 1 (genotipo en la tabla 1) se ha descrito en la solicitud de patente EP10306164.

2. Construcción de la Cepa 2

15 Para incrementar la acumulación de tetrahidrofolato de metileno en la célula, el complejo de escisión de glicina codificado por el operón *gcvTHP* se sobreprodujo al añadir una copia de este operón en el cromosoma en el locus *yjbI*. Esta copia adicional de *gcvTHP* se expresó usando un promotor *trc* inducible artificial y un sitio de unión al ribosoma optimizado, dando la integración cromosómica *ΔyjbI::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km*.

20 Para eliminar el gen *yjbI* y reemplazarlo por la región *Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o a kanamicina pero también un ADN adicional, mientras que se eliminan la mayoría de los genes implicados. Con este propósito, se construyó el siguiente plásmido, *pUC18-ΔyjbI::TT02-Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km*.

25 Este plásmido *pUC18-ΔyjbI::TT02-Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km* se deriva del vector *pUC18* (Norrander y cols., 1983) y aloja el casete de resistencia a kanamicina asociado con la región *Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07*, ambos clonados entre las regiones aguas arriba y aguas abajo de *yjbI*.

30 Para la construcción de *pUC18-ΔyjbI::TT02-Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km*, en primer lugar se construyó el plásmido *pUC18-ΔyjbI::TT02-SMC*. Este plásmido soporta las regiones aguas arriba y aguas abajo de *yjbI* que están separadas por un terminador de la transcripción (T_1 del gen *rnbB* de *E. coli*, llamado TT02) y un sitio de clonación múltiple (compuesto por los sitios de restricción *BstZ17I*, *HindIII*, *AvrII*, *Apal* y *Pacl*, llamado SMC). Esta última región se amplificó por PCR a partir de ADN genómico usando los siguientes oligonucleótidos:

Yjblup-F (SEQ ID N° 1)

CGTAGGCGCCGGTACCGagtgagatcggtggaaggcg

con

- una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (4247987-4248009) de la región *yjbl* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>),

- 5 - una región (mayúsculas) para el sitio de restricción *SfoI* y *KpnI* y bases adicionales.

Yjblup-R (SEQ ID N° 2)

GCTTGTATACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTT
CGTTTTATTTGATGcatttctgtagaattttacacttatagtatcattactgattgagacttca

con

- 10 - una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (4248931-4248980) de la región *yjbl* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>),

- una región (mayúsculas negrita) para el terminador de la transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* (Orosz y cols, 1991),

una región (mayúsculas) para el sitio de restricción *BstZ17I* y parte del sitio de restricción *HindIII* del sitio de clonación múltiple.

- 15 Yjblown-F (SEQ ID N° 3)

AGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTATACAAGCTTTACCTAGGGCCCTT
AATTAAataatgaataagggtgtttaagtaaaggaaaacatcaccgttctgcat

con

- una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (4250286-4250335) de la región *yjbl* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>),

- 20 - una región (mayúsculas negrita) para parte del terminador de la transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* (Orosz y cols., 1991),

- una región (mayúsculas) para todo el sitio de clonación múltiple.

Yjblown-R (SEQ ID N° 4)

CGTAGGCGCCGGTACCGagcataatcattcaccacacatccg

- 25 con

- una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (4251224-4251249) de la región *yjbl* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>),

- una región (mayúsculas) para el sitio de restricción *SfoI* y *KpnI* y bases adicionales.

- 30 En primer lugar, los fragmentos "upYjbl" y "downYjbl" se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de MG1655 usando los oligonucleótidos Yjblup-F / Yjblup-R y Yjblown-F / Yjblown-R, respectivamente. En segundo lugar, el fragmento "upYjbl-downYjbl" se amplificó a partir de los fragmentos de PCR "upYjbl" y "downYjbl" (que poseen una región solapada que incluye una parte del terminador de la transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* y una parte del sitio de clonación múltiple) usando los oligonucleótidos Yjblup-F / Yjblown-R. El fragmento de PCR

"upYjbl-downYjbl" se cortó con la enzima de restricción *SfoI* y se clonó en los sitios *EcoRI* / *HindIII* romos del vector pUC18, dando el plásmido pUC18-*ΔyjbI*::TT02-SMC.

5 A continuación, el casete de resistencia a kanamicina se amplificó por PCR a partir del vector pKD4 usando los siguientes oligonucleótidos:

Km-F (SEQ ID N° 5)

TCCCCCGGGGTATACcatatgaatctccttag

con

10 - una región (minúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko & Wanner, 2000,

- una región (mayúsculas) para los sitios de restricción *SmaI* y *BstZ17I* y bases adicionales.

Km-R (SEQ ID N° 6)

GCCCAAGCTTttaggctggagctgcttcg

con

15 - una región (minúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko & Wanner, 2000

- una región (mayúsculas) para el sitio de restricción *HindIII* y bases adicionales.

20 El fragmento de PCR se cortó con las enzimas de restricción *BstZ17I* y *HindIII* y se clonó en los sitios *BstZ17I* / *HindIII* del plásmido pUC18-*ΔyjbI*::TT02-SMC, dando el plásmido pUC18-*ΔyjbI*::TT02-SMC::Km.

25 Finalmente, el fragmento *Ptrc01/RBS01-gcvTHP*-TT07 se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de la cepa 1 usando los oligonucleótidos *Ptrc01/RBS01-GcvTHP-F* / *GcvTHP-TT07-R* (descritos posteriormente). El fragmento de PCR se cortó con las enzimas de restricción *Apal* y *Pacl* y se clonó en los sitios *Apal* / *Pacl* del plásmido pUC18-*ΔyjbI*::TT07-SMC::Km, dando el plásmido pUC18-*ΔyjbI*::TT02-*Ptrc01/RBS01-gcvTHP*-TT07::Km. Los plásmidos recombinantes se verificaron mediante secuenciación de ADN.

Ptrc01/RBS01-GcvTHP-F (SEQ ID N° 7)

CGTAGGCCTGGGCCGgagctgttgacaattaatcatccg

con

30 - una región (minúsculas) homóloga a una parte del promotor *trc* inducible artificial situado aguas arriba del operón *gcvTHP* en la cepa 1,

- una región (mayúsculas) para los sitios de restricción *StuI* y *Apal* y bases adicionales.

GcvTHP-TT07-R (SEQ ID N° 8)

CGAAGGCCTTTAATTAAGCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAGGCGGC

CGCttactggtattcgctaatacgtacg

con

35 - una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (3044190-3044214) del gen *gcvP* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>),

- una región (mayúsculas negrita) para la secuencia del terminador de la transcripción T7te, llamada TT07 (Harrington y cols., 2001),

- una región para los sitios de restricción *PacI*, *StuI* y bases adicionales.

5 Finalmente, el fragmento *ΔyjbI::TT02-Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km* se obtuvo al cortar el plásmido pUC18-*ΔyjbI::TT02-Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km* con la enzima de restricción *KpnI* y a continuación se introdujo mediante electroporación, según el Protocolo 1, en una cepa MG1655 *metA*11 pKD46*. A continuación, se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina y la inserción del fragmento *ΔyjbI::TT02-Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km* se verificó mediante un análisis de PCR con los oligonucleótidos *yjbI-gcvTHP-F* y *yjbI-gcvTHP-R*.
10 La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA*11 pKD46 ΔyjbI::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km*.

yjbI-gcvTHP-F (SEQ ID N° 9)

cagaccaccaactggcgacc

homóloga a la secuencia (4247754-4247774) de la región *yjbI* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>)

15 *yjbI-gcvTHP-R* (SEQ ID N° 10)

gccattggaatcgaccagcc

homóloga a la secuencia (4251489-4251508) de la región *yjbI* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>)

20 A continuación, la modificación cromosómica *ΔyjbI::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km* se transdujo en la cepa 1, según el Protocolo 2.

Se seleccionaron transductantes resistentes a kanamicina y la presencia de la modificación cromosómica *ΔyjbI::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km* se verificó mediante PCR con los cebadores *yjbI-gcvTHP-F* y *yjbI-gcvTHP-R*.
25

La cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc01*2/RBS08*1-metH Ptrc01-cysPUWAM Ptrc01-cysJIH Ptrc01/RBS01-gcvTHP Ptrc01/ARN01/RBS01-metF Ptrc94-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/RBS01*4-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔtreBC::RN/serA-serC ΔyjbI:: RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km* se denominó cepa 2.
30

3. Construcción de la cepa 3

35 Para la construcción de la cepa 3, el casete de resistencia asociado con la integración cromosómica *ΔyjbI::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km* de la cepa 2 se retiró según el Protocolo 1.

Se seleccionaron clones sensibles a kanamicina y la ausencia del casete de kanamicina se verificó mediante PCR con los cebadores *yjbI-gcvTHP-F* y *yjbI-gcvTHP-R*.

40 La cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc01*2/RBS08*1-metH Ptrc01-cysPUWAM Ptrc01-cysJIH Ptrc01/RBS01-gcvTHP Ptrc01/ARN01/RBS01-metF Ptrc94-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/RBS01*4-thA*1-cysE ΔpgaABCD::RN/PR01/RBS01-thA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::RN/PR01/RBS01-thA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔtreBC::RN/serA-serC ΔyjbI:: RN/PtRc01/RBS01-gcvTHP-TT07* se denominó cepa 3.
45

4. Construcción de la cepa 4

El plásmido pCL1920-PgapA-pycre-TT07, descrito en la solicitud de patente PCT/FR2010/052937, se introdujo en la cepa 2, dando la siguiente cepa MG1655 *metA**11 *Ptrc01**2/*RBS08**1-*metH* *Ptrc01*-*cysPUWAM* *Ptrc01*-*cysJIH* *Ptrc01*/*RBS01*-*gcvTHP* *Ptrc01*/*ARN01*/*RBS01*-*metF* *Ptrc94*-*serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::RN/PRM-C/857-TT*adcca*-PR01/*RBS01**4-*thrA**1-*cysE* Δ *pgaABCD*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-PgapA-*metA**11 Δ *uxaCA*::RN/PR01/*RBS01*-*thA**1-*cysE*-PgapA-*metA**11 Δ *CP4-6*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-PgapA-*metA**11 Δ *wcaM*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-PgapA-*metA**11 Δ *treBC*::RN/*serA*-*serC* Δ *yjbl*::RN/*Ptrc01*/*RBS01*-*gcvTHP*-TT07::Km (pCL1920-PgapA-pycre-TT07), denominada cepa 4.

5. Construcción de la cepa 5

10 Para incrementar el flujo en la ruta de la serina, los genes *serC* y *serA* se sobreexpresaron debido a promotores artificiales y un sitio de unión al ribosoma optimizado y usando el cromosoma artificial bacteriano pCC1BAC (Epicentre). Con este propósito, se construyó el siguiente plásmido pCC1BAC-TT02-*Ptrc30*/*RBS01*-*serC*-TT07*2-*Ptrc30*/*RBS01*-*serA*-TT*adcca*.

15 Para la construcción de pCC1BAC-TT02-*Ptrc30*/*RBS01*-*serC*-TT07*2-*Ptrc30*/*RBS01*-*serA*-TT*adcca*, las regiones "TT02-*Ptrc30*/*RBS01*-*serC*-TT07*2" y "*Ptrc30*/*RBS01*-*serA*-TT*adcca*" se amplificaron por PCR.

20 Para la región "TT02-*Ptrc30*/*RBS01*-*serC*-TT07*2", en primer lugar se sintetizó un megacebador que alojaba el terminador de la transcripción (*T*₁ de *rrmB*, indicado TT02), el promotor artificial (*Ptrc30*), el sitio de unión al ribosoma optimizado (*RBS01*) y el principio del gen *serC* mediante una PCR corta usando los oligonucleótidos *Ptrc30*/*RBS01*-F y *Ptrc30*/*RBS01*-*serC*-R (descritos posteriormente) sin añadir matriz. En segundo lugar, el fragmento "TT02-*Ptrc30*/*RBS01*-*serC*-TT07*2" se amplificó mediante PCR usando ADN genómico de *E. coli* MG1655 como matriz y el megacebador sintetizado y el oligonucleótido *serC*-TT07*2-R (descrito posteriormente).

Ptrc30/*RBS01*-F (SEQ ID N° 11)

25 **tcggcgccttaattaaCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTT**
TCGTTTTATCTGTT*tagctaGAGCTGTTGACGATTAATCATCCGGCTCGTATACTG*
TGTGGAATAAGGAGGTATATT

con

- una región (mayúsculas negrita) para el terminador de la transcripción *T*₁ del gen *rrmB* de *E. coli* (Orosz y cols., 1991),

- una región (mayúscula subrayado) homóloga al promotor *trc* inducible artificial,

30 - una región (mayúsculas cursiva) homóloga a un sitio de unión al ribosoma optimizado,

una región (minúsculas) para los sitios de restricción *NarI*, *PacI* y bases adicionales.

Ptrc30/*RBS01*-*serC*-R (SEQ ID N° 12)

ccgaactaaaattgaagattgagccatAATATACCTCCTTATCCACACAGTATACGAGC

con

35 - una región (mayúscula subrayado) homóloga al promotor *trc* inducible artificial,

- una región (mayúsculas cursiva) homóloga a un sitio de unión al ribosoma optimizado,

- una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (956876-956904) del gen *serC* (secuencia de referencia en el ciber sitio <http://www.ecogegene.org/>).

serC-TT07*2-R (SEQ ID N° 13)

CCCAAGCTTGCATGCGCTAGCGAGCTCGAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAG
CCAGG*ttaaccgtgacggcggttgc*

con

- una región (mayúsculas **negrita**) para la secuencia del terminador de la transcripción T7te (Harrington y cols., 2001) que posee una eliminación de base en la posición 29^a (denominada TT07*2),

5 - una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (957946-957964) del gen *serC* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>),

- una región (mayúsculas) para los sitios de restricción *HindIII*, *SphI*, *SacI* y *NheI* y bases adicionales.

10 Del mismo modo, el fragmento "*Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca*" se amplificó mediante PCR usando ADN genómico de *E. coli* MG1655 como matriz y los oligonucleótidos *Ptrc30/RBS01-serA-F* y *serA-TTadcca-R* (descritos posteriormente).

Ptrc30/RBS01-serA-F (SEQ ID N° 14)

TACGTAGCTAGCGAGCTGTTGACGATTAATCATCCGGCTCGTATACTGTGTGGA
ATAAGGAGGTATATTatggcaaaggtatcgctggagaaag

con

- una región (mayúsculas subrayado) homóloga al promotor *trc* inducible artificial,

15 - una región (mayúsculas *cursiva*) homóloga a un sitio de unión al ribosoma optimizado,

- una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (3056408-3056432) del gen *serA* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>),

- una región (mayúsculas) para el sitio de restricción *NheI* y bases adicionales.

serA-TTadcca-R (SEQ ID N° 15)

20 **CCCAAGCTTGCATGCCCTAGGTAATAAGAGTTACCATTTAAGGTAA**
CTCTTATTTTTT*Attagtagcagcagacggcgcg*

- una región (mayúsculas **negrita**) para la secuencia del terminador de transcripción *TTadc* (terminador de la transcripción del gen *adc* procedente de *Clostridium acetobutylicum*, homólogo desde 179847 hasta 179807 del megaplásmido pSLO1),

25 - una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (3055200-3055220) del gen *serA* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>),

- una región (mayúsculas) para los sitios de restricción *AvrII*, *SphI*, *HindIII* y bases adicionales.

30 Los fragmentos de PCR "*TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2*" y "*Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca*" se cortaron con las enzimas de restricción *NarI* / *NheI* y *NheI* / *SphI*, respectivamente, y ambos se clonaron en los sitios *NarI* / *SphI* del plásmido pCC1BAC, dando el plásmido pCC1BAC-*TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca*.

El plásmido recombinante se verificó mediante secuenciación de ADN.

35 Finalmente, el plásmido pCC1BAC-*TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca* se introdujo en la cepa 4, dando la siguiente cepa MG1655 *metA*11 Ptrc01*2/RBS08*1-metH Ptrc01-cysPUWAM Ptrc01-cysJIH Ptrc01/RBS01-gcvTHP Ptrc01/ARN01/RBS01-metF Ptrc94-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA*

5 *ΔmalS*::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/RBS01*4-*thrA**1-*cysE* *ΔpgaABCD*::RN/PR01/RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 *ΔuxaCA*::RN/PR01/RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 *ΔCP4-6*::RN/PR01/RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 *ΔwcaM*::RN/PR01/RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 *ΔtreBC*::RN/*serA-serC* *ΔyjbI*::RN/*Ptrc01*/RBS01-*gcvTHP*-TT07::Km (pCL1920-*PgapA-pycre*-TT07) (pCC1BAC-TT02-*Ptrc30*/RBS01-*serC*-TT07*2-*Ptrc30*/RBS01-*serA*-TTadcca), denominada cepa 5.

6. Identificación de la mutación *metE* en la cepa 5

A medir la actividad de metionina sintasa (METE) de la cepa 5, se identificó que el gen *metE* no era funcional, debido a que algunas mutaciones dan una proteína MetE truncada.

10 La mutación es una eliminación de 13 pb (de la base 417^o a la 429^o del gen) del gen *metE* que conduce a una mutación por cambio de marco. Por consiguiente, la traducción de la proteína se acorta (codón de terminación introducido por el cambio de marco) y da lugar a una proteína truncada de 152 aminoácidos en lugar de 753.

Aquí está la secuencia de la proteína WT MetE (SEQ ID N° 21):

MTILNHTLGFPRVGLRRELKKAQESYWAGNSTREELLAVGRELRARHWDQKQQA
 GIDLLPVGDFAWYDHVLTTSLLLGNVPAHQNKDGSVDIDTLFRIGRGRAPTGEPA
 AAAEMTKWFNTNYHYMVPEFVKGQQFKLWTQLLDEVDEALALGHKVKPVLLG
 PVTWLWLGKVKGEQFDRLSLLNDILPVYQQVLAELAKRGIEWVQIDEPALVLELP
 QAWLDAYKPAYDALQGQVKLLLTTFYFEGVTPNLDITALPVQGLHVDLVHGKDD
 VAELHKRLPSDWLLSAGLINGRNVWRADLTEKYAQIKDIVGKRDLWVASSCSLLH
 SPIDLSVETRLDAEVKSWFAFALQKCHELALLRDALNSGDTAALAEWSAPIQARR
 HSTRVHNPAVEKRLAAITAQDSQRANVYEVRAEAQRARFKLPAWPTTTIGSFPQT
 TEIRTLRLDFKKNLDANNYRTGIAEHIKQAIVEQERLGLDVLVHGEAERNMVE
 YFGEHLDFGVFTQNGWVQSYGSRCVKPPIVIGDISRPAPITVEWAKYAQSLTDKPV
 KGMLTGPVTILCWSFPREDVSRETIAKQIALALRDEVADLEAAGIGIIQIDEPALREG
 LPLRRSDWDAYLQWGVEAFRINAATAVAKDDTQIHTHMCYCEFNDIMDSIAALDAD
 VITIETSRSDMELLESFEEFDYPNEIGPGVYDIHSPNVPSVEWIEALLKKAAKRIPAE
 15 RLWVNPDCGLKTRGPETRAALANMVQAAQNLRRG*

Aquí está la secuencia de la proteína truncada MetE* (SEQ ID N° 22):

MTILNHTLGFPRVGLRRELKKAQESYWAGNSTREELLAVGRELRARHWDQKQQA
 GIDLLPVGDFAWYDHVLTTSLLLGNVPAHQNKDGSVDIDTLFRIGRGRAPTGEPA
 AAAEMTKWFNTNYHYMVPEFVKGQQFKLWTWKWTRRWATR*

20 Ejemplo 3: Construcción de la cepa 7, MG1655 *metA**11 *metE*::Km *Ptrc01**2/RBS08*1-*metH* *Ptrc01-cysPUWAM*
Ptrc01-cysJIH *Ptrc01/RBS01-gcvTHP* *Ptrc01/ARN01/RBS01-metF* *Ptrc94-serB* *ΔmetJ* *ΔpykF* *ΔpykA* *ΔpurU* *ΔyncA*
ΔmalS::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/RBS01*4-*thrA**1-*cysE* *ΔpgaABCD*::RN/PR01/RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-*
*metA**11 *ΔuxaCA*::RN/PR01/RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 *ΔCP4-6*::RN/PR01/RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-*
*metA**11 *ΔwcaM*::RN/PR01/RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 *ΔtreBC*::RN/*serA-serC* *ΔyjbI*::RN/*Ptrc01*/RBS01-
 25 *gcvTHP*-TT07 (pCL1920-*PgapA-pycre*-TT07) (pCC1BAC-TT02-*Ptrc30*/RBS01-*serC*-TT07*2-*Ptrc30*/RBS01-*serA-*
 TTadcca)

1. Construcción de la cepa 6

Para estudiar si la restauración de una proteína MetE funcional podía modificar la producción de metionina de la cepa 5, se reemplazó el gen *metE* truncado por uno silvestre usando la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000).

30 Con este propósito, el casete de kanamicina flanqueado con fragmentos homólogos a la región *metE*, el fragmento, "*metE*::Km", se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos *metE*-Km-F y *metE*-Km-R (descritos posteriormente).

El fragmento "*metE::Km*" se introdujo en una cepa MG1655 *metA** 11 pKD46 que posee una versión funcional del gen *metE*.

metE-Km-F (SEQ ID N° 16)

agaaaccgcgcggcactggcgaacatggtgcagggcggcgagaaactgcgtcgggggtaaaatccaaaccgggtgtaata
ccaccggtcttttctcaTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

5 con

- una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (4013277-4013376) de la región *metE* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>),

- una región (mayúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko & Wanner, 2000).

10 *metE*-Km-R (SEQ ID N° 17)

gcagaagatggctggcagcgtatgctggaatggtttaagcagtatggtgggaagaagtcgctgtaaGCAGAAAGGCC
CACCCGAAGGTGAGCCAGTGTGACATATGAATATCCTCCTTAG

con

- una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (4013377-4013442) de la región *metE* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>),

15 - una región (mayúsculas negrita) para la secuencia del terminador de la transcripción T7te (Harrington y cols., 2001),

- una región (mayúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko & Wanner, 2000).

20 Se seleccionaron recombinantes resistentes a kanamicina y la presencia del casete Km aguas abajo del gen *metE* se verificó mediante PCR con los oligonucleótidos *metE*-F y *metE*-R (descritos posteriormente). La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA**11 pKD46 *metE::Km*.

metE-F (SEQ ID N° 18)

cgtttgggactggatgtgctgg

25 homóloga a la secuencia (4012495-4012516) de la región *metE* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>)

metE-R (SEQ ID N° 19)

gcgtggtacggcaaactgac

homóloga a la secuencia (4013672-4013691) de la región *metE* (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/>)

30 La modificación cromosómica *metE::Km* se transdujo a continuación en la cepa 3, según el Protocolo 2.

Se seleccionaron recombinantes resistentes a kanamicina y la presencia del casete Km aguas abajo del gen *metE* se verificó mediante PCR con los oligonucleótidos *metE*-F y *metE*-R (descritos anteriormente). La presencia del gen *metE* con la secuencia silvestre se verificó mediante secuenciación de ADN.

35

La cepa resultante MG1655 *metA**11 *metE*::Km *Ptrc01**2/*RBS0**1-*metH* *Ptrc01*-*cysPUWAM* *Ptrc01*-*cysJIH* *Ptrc01*/*RBS01*-*gcvTHP* *Ptrc01*/*ARN01*/*RBS01*-*metF* *Ptrc94*-*serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/*RBS01**4-*thrA**1-*cysE* Δ *pgaABCD*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11 Δ *uxaCA*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11 Δ *CP4-6*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11 Δ *wcaM*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11 Δ *treBC*::RN/*serA*-*serC* Δ *yjbl*::RN/*Ptrc01*/*RBS01*-*gcvTHP*-TT07 se denominó cepa 6.

2. Construcción de la cepa 7

El plásmido pCL1920-*PgapA*-*pycre*-TT07 (descrito en la solicitud de patente PCT/FR2010/052937) y el plásmido pCC1BAC-TT02-*Ptrc30*/*RBS01*-*serC*-TT07*2-*Ptrc30*/*RBS01*-*serA*-TTadcca (descrito anteriormente) se introdujeron en la cepa 6, dando la cepa MG1655 *metA**11 *metE*::Km *Ptrc01**2/*RBS08**1-*metH* *Ptrc01*-*cysPUWAM* *Ptrc01*-*cysJIH* *Ptrc01*/*RBS01*-*gcvTHP* *Ptrc01*/*ARN01*/*RBS01*-*metF* *Ptrc94*-*serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/*RBS01**4-*thrA**1-*cysE* Δ *pgaABCD*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11 Δ *uxaCA*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11 Δ *CP4-6*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11 Δ *wcaM*::RN/PR01/*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11 Δ *treBC*::RN/*serA*-*serC* Δ *yjbl*::RN/*Ptrc01*/*RBS01*-*gcvTHP*-TT07 (pCL1920-*PgapA*-*pycre*-TT07) (pCC1BAC-TT02-*Ptrc30*/*RBS01*-*serC*-TT07*2-*Ptrc30*/*RBS01*-*serA*-TTadcca), denominada cepa 7.

La medida de la actividad de metionina sintasa independiente de cobalamina (MS, MetE) de la cepa 6 confirmaba que la proteína MetE es funcional.

20 EJEMPLO 4: PRODUCCIÓN DE L-METIONINA MEDIANTE FERMENTACIÓN EN BIORREACTOR

Cepas que producían cantidades sustanciales de metionina se probaron posteriormente bajo condiciones de producción en fermentadores de 0,5 l (GX, GPC) usando una estrategia de alimentación por lotes.

Brevemente, se usó un cultivo de 24 horas desarrollado en 10 ml de medio LB con 2,5 g.l⁻¹ de glucosa para inocular un precultivo de 24 horas en medio mínimo (B1a). Estas incubaciones se llevaron a cabo en matraces tabicados de 500 ml que contenían 40 ml de medio mínimo (B1a) en un agitador giratorio (200 RPM). El primer precultivo se realizó a una temperatura de 30°C, el segundo a una temperatura de 34°C.

Una tercera etapa de precultivo se llevó a cabo en biorreactores (Sixfors) cargados con 200 ml de medio mínimo (B1b) inoculado hasta una concentración de biomasa de 1,2 g.l⁻¹ con 5 ml de precultivo concentrado. La temperatura del precultivo se mantuvo constante a 34°C y el pH se ajustó automáticamente hasta un valor de 6,8 usando una solución de NH₄OH al 10%. La concentración de oxígeno disuelto se ajustó continuamente hasta un valor de 30% de la saturación de presión de aire parcial con suministro de aire y/o agitación. Después del agotamiento de glucosa del medio del lote, se inició la alimentación por lotes con un caudal inicial de 0,7 ml.h⁻¹ se incrementó exponencialmente durante 24 horas con una velocidad de crecimiento de 0,13 h⁻¹ a fin de obtener una concentración celular final de aproximadamente 20 g.l⁻¹.

Tabla 4: Composición del medio mineral del lote de precultivo (B1a y B1b).

| Compuesto | Concentración de B1a (g.l ⁻¹) | Concentración de B1b (g.l ⁻¹) |
|---|---|---|
| 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 |
| Citrato de Fe(III) H ₂ O | 0,1064 | 0,1064 |
| EDTA | 0,0084 | 0,0084 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1,00 | 1,00 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,08 | 0,08 |
| Ácido cítrico | 1,70 | 1,70 |
| KH ₂ PO ₄ | 4,57 | 4,57 |
| K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 2,50 | 2,50 |

| Compuesto | Concentración de B1a (g.l ⁻¹) | Concentración de B1b (g.l ⁻¹) |
|---|---|---|
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 1,10 | 1,10 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 4,90 | 4,90 |
| (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ | 1,00 | 1,00 |
| Tiamina | 0,01 | 0,01 |
| Vitamina B12 | 0,01 | 0,01 |
| Glucosa | 30,00 | 5,00 |
| MOPS | 30,00 | 0,00 |
| NH ₄ OH 28% | Ajustado hasta pH 6,8 | Ajustado hasta pH 6,8 |

Tabla 5: Composición del medio mineral de alimentación por lotes 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 |
| 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 |
| Citrato de Fe(III) H ₂ O | 0,0424 |
| EDTA | 0,0067 |
| MgSO ₄ | 5,00 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 8,30 |
| Na ₂ SO ₄ | 8,90 |
| (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ | 24,80 |
| Tiamina | 0,01 |
| Glucosa | 500,00 |
| Vitamina B 12 | 0,01 |
| NH ₄ OH 28% | Ajustado hasta pH 6,8 |

Tabla 6: Composición del medio mineral del lote de cultivo (B2).

| 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 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,0025 |
| H ₃ BO ₃ | 0,0030 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,0025 |
| Citrato de Fe(III) H ₂ O | 0,1064 |
| EDTA | 0,0084 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1,00 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,08 |
| Ácido cítrico | 1,70 |
| KH ₂ PO ₄ | 2,97 |

| Compuesto | Concentración (g.l ⁻¹) |
|---|------------------------------------|
| K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 1,65 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0,72 |
| (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ | 3,74 |
| Tiamina | 0,01 |
| Vitamina B 12 | 0,01 |
| Biotina | 0,10 |
| Glucosa | 10,00 |
| NH ₄ OH 28% | Ajustado hasta pH 6,8 |

Tabla 7: Composición del medio de alimentación por lotes 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 |
| Citrato de Fe(III) H ₂ O | 0,0524 |
| EDTA | 0,0067 |
| MgSO ₄ | 5,00 |
| (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ | 55,50 |
| Tiamina | 0,01 |
| Vitamina B12 | 0,01 |
| Biotina | 0,10 |
| Glucosa | 500,00 |

5 Posteriormente, fermentadores de 0,5 l GX (GPC) se cargaron con 220 ml de medio mínimo (B2) y se inocularon hasta una concentración de biomasa de 2,1 g.l⁻¹ con un volumen de precultivo que variaba entre 20 y 30 ml.

10 La temperatura de cultivo se mantuvo constante a 37°C y el pH se en el valor de trabajo (6,8) mediante la adición automática de soluciones de NH₄OH (NH₄OH 10%). La agitación inicial se ajustó a 200 RPM durante la fase discontinua y se incrementó hasta 1000 RPM durante la fase de alimentación por lotes. El caudal de aire inicial se ajustó a 0,3 l.min⁻¹ durante la fase discontinua y se incrementó hasta 0,7 l.min⁻¹ al principio de la fase de alimentación por lotes. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en valores entre 20 y 40%, preferentemente 30% de saturación al incrementar la agitación.

15 Cuando la masa celular alcanzaba una concentración cercana a 5 g.l⁻¹, la alimentación por lotes se comenzó con un caudal inicial de 1,9 ml.h⁻¹. La solución de alimentación se inyectó con un perfil sigmoideo con un caudal creciente que alcanzaba 8,8 ml.h⁻¹ después de 26 horas. Las condiciones de alimentación precisas se calcularon mediante la

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

20 donde Q(t) es el caudal de alimentación en ml.h⁻¹ para un volumen del lote de 600 ml con p1 = 0,66, p2 = 8,21, p3 = 0,27, p4 = 6,50.

Después de 26 horas de alimentación por lotes, la bomba de la solución de alimentación se detuvo y el cultivo se terminó después del agotamiento completo de glucosa.

Los aminoácidos extracelulares se cuantificaron mediante HPLC después de la derivación con OPA/Fmoc y otros metabolitos pertinentes se analizaron usando HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa) y GC-MS después de la siliación.

- 5 **Tabla 8:** Rendimiento de metionina final ($Y_{met\ final}$) en % g de metionina por g de glucosa producida en un cultivo de alimentación por lotes por las diferentes cepas. Para la definición del rendimiento de metionina/glucosa, véase posteriormente. Cada cepa se evaluó una vez.

| Cepa | $Y_{met\ final}$ |
|--------|------------------|
| Cepa 5 | 0.225 |
| Cepa 7 | 0.186 |

- 10 Como se puede observar en la tabla 8 anteriormente, el rendimiento de producción de metionina se incrementaba significativamente con la mutación del gen *metE*. La cepa 5, que contenía el gen *metE* mutado, tiene un rendimiento superior de 4 puntos en comparación con la cepa 7 que contiene una proteína MetE funcional.

- 15 El volumen del fermentador se calculó al añadir al volumen inicial del reactor la cantidad de las soluciones añadidas para regular el pH para alimentar el cultivo y al sustraer el volumen usado para el muestreo y la pérdida por evaporación.

- 20 El volumen de la alimentación por lotes se siguió continuamente al pesar el material de alimentación. A continuación, la cantidad de glucosa inyectada se calculó basándose en el peso 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:

$$Y_{met} = \frac{Metionina_t * V_t - Metionina_0 * V_0 * 100}{Glucosa\ consumida_t}$$

El rendimiento final obtenido durante el cultivo se presentó en la presente para cada cepa. Con $Metionina_0$ y $Metionina_t$, respectivamente, las concentraciones de metionina inicial y final y V_0 y V_t los volúmenes inicial y final.

$$volumen\ alimentado_t = \frac{peso\ alimentado_0 - peso\ alimentado_t}{densidad\ solución\ alimentada}$$

La glucosa consumida se calculó como sigue:

- 25 $Glucosa\ Inyectada_t = volumen\ alimentado_t * [Glucosa]$
 $Glucosa\ consumida_t = [Glucosa]_0 * V_0 + Glucosa\ Inyectada - [Glucosa]_{residual} * V_t$

Con $[Glucosa]_0$, $[Glucosa]$, $[Glucosa]_{residual}$, respectivamente, las concentraciones de glucosa inicial, la alimentada y residual.

- 30 EJEMPLO 5: MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE METIONINA SINTASA INDEPENDIENTE DE COBALAMINA (METE).

- 35 Para la determinación in vitro de la actividad de metionina sintasa independiente de cobalamina (MS, MetE), las cepas 7 y 5 de *E. coli* que soportaban el gen *metE* silvestre o mutado se cultivaron en medio mínimo según se describe en el ejemplo 3 anteriormente y se recogieron al final de la fase logarítmica mediante centrifugación. Las pellas se resuspendieron en tampón de fosfato potásico 20 mM frío 7,2 que contiene un cóctel de inhibidores de proteasa con EDTA. A continuación, las células se rompieron batiendo con cuentas con un sistema Precellys (Bertin Technologies; 2x10s a 6500 rpm) seguido por centrifugación a 12000 g a 4°C durante 30 minutos. Los sobrenadantes se desalaron y se usaron para análisis enzimáticos. Las concentraciones de proteínas se determinaron usando el reactivo de ensayo Bradford (Bradford, 1976).

- 40 Para la determinación de la actividad de MS, se incubaron 40 µg de extractos celulares brutos durante 15 minutos a 37°C con 1 mM de DL-homocisteína y 0,25 mM triglutamato de metil-tetrahydropteróilo en 100 mM de tampón de fosfato potásico pH 7,2, 5 mM de MgSO₄. La metionina producida por la enzima metionina sintasa independiente de cobalamina se cuantificó mediante GC-MS después de la derivación con terc-butildimetilsililtrifluoroacetamida (TBDMSTFA). Se incluyeron aspartato y norleucina como patrones internos.

- 45 Los resultados de las actividades de metionina sintasa independiente de cobalamina se presentan en la tabla 9 posteriormente.

Tabla 9: Actividades de metionina sintasa independiente de cobalamina (en mUI/mg de proteínas) de cepas de *E. coli* que soportan enzimas silvestres o mutadas. Cada cepa se evaluó una vez.

| Cepa | MS (mUI/mg de proteínas) |
|--------|--------------------------|
| Cepa 5 | 0 |
| Cepa 7 | 12,7 |

5 Como se puede observar en la tabla 9, la cepa 5 ($\Delta metE$) ha perdido completamente su actividad de MS mientras que la cepa 7 mantiene una significativa. Esta pérdida de actividad se correlacionaba con una mejora significativa de la producción de metionina.

10 EJEMPLO 6: EFECTO DE LA ELIMINACIÓN DEL GEN *METE* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE L-METIONINA

Para evaluar el efecto de una eliminación completa del gen *metE* sobre la producción de L-metionina, se eliminó el gen *metE* mutado de la cepa 5. Se introdujo una eliminación limpia del gen *metE* en esa cepa usando la recombinación homóloga que se describe previamente y usando la estrategia proporcionada por Datsenko & Wanner (2000).

15 Después de la sustitución del gen *metE* mutado por el casete de kanamicina, los recombinantes resistentes a kanamicina se seleccionan y se verifican mediante secuenciación de ADN.

Uno de ellos se cultiva como se describe en el ejemplo 4 y la L-metionina producida se cuantifica mediante HPLC.

20 La cepa con la eliminación limpia de *metE* produce más metionina que la cepa 7 que posee una proteína MetE funcional: la eliminación de *metE* da como resultado un rendimiento incrementado de metionina de más de 15%.

REFERENCIAS

- Anderson**, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **32**:120-128.
- Bradford**, 1976, *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Carrier y Keasling**, 1998/1999, *Biotechnol. Prog.* **15**: 58-64.
- 5 **Chu J, y cols.**, 1985, *Arch Biochem Biophys.* **239**:467-474.
- Datsenko y Wanner**, 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 6640-6645.
- Foster y cols.**, 1961, *Biochem. J.* **80**: 519-531.
- González y cols.**, 1992, *Biochemistry.* **31**: 6045-6056.
- Harrington, Laughlin y Liang**, 2001 *Proc Natl Acad Sci U S A. Abr 24*; **98(9)**:5019-24.
- 10 **Hondorp y Matthews**, 2009, *J. Bacteriol.* **191**: 3407-3410.
- Kumar y cols.**, 2005, *Biotechnol. Adv.* **23**:41-61.
- Liebl y cols.**, 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 205-210.
- 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, Nueva York.
- 15 **Norlander y cols.**, 1983. *Gene.* **26**: 101-106.
- Orosz y cols.**, 1991, *Eur. J. Biochem.* **201** : 653-659
- Prescott y cols.**, 1999, "Microbiology" 4ª Edición, WCB McGraw-Hill.
- Riedel y cols.**, 2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 573-583.
- 20 **Sambrook y cols.**, 1989 and 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2ª y 3ª Ediciones, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saunderson**, 1985 *British Journal of Nutrition* **54**: 621-633.
- Schaefer y cols.** 1999, *Anal. Biochem.* **270**: 88-96.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> METABOLIC EXPLORER DISCHERT, Wanda FIGGE, Rainer
- <120> Microorganismo recombinante para la producción fermentativa de metionina
- <130> 360894 D31034
- 5 <160> 22
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- < 211> 39
- < 212> ADN
- 10 < 213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido
- <400> 1
- cgtaggcgcc ggtaccgagt gcagatcggc tggaaggcg 39
- 15 <210> 2
- < 211> 115
- < 212> ADN
- < 213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 < 223> Oligonucleótido
- <400> 2
- gcttgtatac aacagataaa acgaaaggcc cagtctttcg actgagcctt tcgttttatt 60
- tgatgcattt ctgtagaatt ttacacttat agtatcatta ctgattgaga cttca 115
- <210> 3
- < 211> 108
- 25 < 212> ADN
- < 213> Secuencia Artificial
- <220>

ES 2 632 170 T3

< 223> Oligonucleótido
<400> 3
agactgggcc ttcgtttta tctgttgtat acaagcttta cctagggccc ttaattaaat 60
aatgaataag ggtgtttaag taaaggaaaa catcaccggt cctggcat 108
<210> 4
5 < 211> 42
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> Oligonucleótido
10 <400> 4
cgtaggcgcc ggtaccagc ataatcattc accacacatc cg 42
<210> 5
< 211> 35
< 212> ADN
15 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> Oligonucleótido
<400> 5
tccccgggg tataccatat gaatcctc ctag 35
20 <210> 6
< 211> 30
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
25 < 223> Oligonucleótido
<400> 6
gccaagctt ttaggctgg agctgctcg 30

<210> 7
 < 211> 39
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 < 223> Oligonucleótido
 <400> 7
 cgtaggcctg ggcccgagct gttgacaatt aatcatccg 39
 <210> 8
 10 < 211> 79
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Oligonucleótido
 15 <400> 8
 cgaaggcctt taattaagca gaaaggccca cccgaaggtg agccaggcgg cgccttactg 60
 gtattcgcta atcggtagc 79
 <210> 9
 < 211> 21
 < 212> ADN
 20 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Oligonucleótido
 <400> 9
 cagaccaccc aactggcgac c 21
 25 <210> 10
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial

ES 2 632 170 T3

<220>

< 223> Oligonucleótido

<400> 10

gccattggaa tcgaccagcc 20

5 <210> 11

< 211> 134

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

10 < 223> Oligonucleótido

<400> 11

tcggcgcctt aattaacatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg 60

ttttatctgt ttacgtagag ctggtgacga ttaatcatcc ggctcgtata ctgtgtggaa 120

taaggaggta tatt 134

<210> 12

< 211> 62

15 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Oligonucleótido

<400> 12

ccagaactaa aattgaagat ttgagccata atatacctcc ttattccaca cagtatacga 60

20 gc 62

<210> 13

< 211> 75

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

25 <220>

< 223> Oligonucleótido

ES 2 632 170 T3

<400> 13

cccaagcttg catgcgctag cgagctcgag aaaggccac ccgaaggtga gccaggttaa 60

ccgtgacggc gttcg 75

<210> 14

< 211> 94

5 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Oligonucleótido

<400> 14

tacgtagcta gcgagctggt gacgattaat catccgctc gtatactgtg tggataaagg 60

10 aggtatatta tggcaaaggt atcgctggag aaag 94

<210> 15

< 211> 85

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>

< 223> Oligonucleótido

<400> 15

cccaagcttg catgccctag gtaaaaaaaaa taagagttac catttaaggt aactcttatt 60

tttattagta cagcagacgg gcgcg 85

<210> 16

20 < 211> 120

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Oligonucleótido

25 <400> 16

ES 2 632 170 T3

agaaacccgc gcggcactgg cgaacatggt gcagggcgcg cagaacttgc gtcgggggta 60
 aatccaaac cgggtggtaa taccacccgg tcttttctca ttaggctgg agctgcttgc 120
 <210> 17
 < 211> 120
 < 212> ADN
 5 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Oligonucleótido
 <400> 17
 gcagaagatg gctggcagcg tatgctgaa tggtttaagc agtatggtgg gaagaagtcg 60
 ctgtaagcag aaaggccac ccgaaggtga gccagtgtga catatgaata tcctccttag 120
 10 <210> 18
 < 211> 22
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 < 223> Oligonucleótido
 <400> 18
 cgttgggac tggatgtgct gg 22
 <210> 19
 < 211> 20
 20 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Oligonucleótido
 <400> 19
 25 gcgtggtacg gcaaactgac 20
 <210> 20
 < 211> 2262

ES 2 632 170 T3

< 212> ADN

< 213> Escherichia coli

<400> 20

ES 2 632 170 T3

| | |
|---|------|
| atgacaatat tgaatcacac cctcggtttc cctcgcgttg gcctgcgtcg cgagctgaaa | 60 |
| aaagcgcaag aaagttattg ggcggggaac tccacgcgtg aagaactgct ggcggtaggg | 120 |
| cgtgaattgc gtgctcgtca ctgggatcaa caaaagcaag cgggtatcga cctgctgccg | 180 |
| gtgggcgatt ttgcttgga cgatcatgta ctgaccacca gtctgctgct gggtaacgtt | 240 |
| cggcgcgctc atcagaacaa agatggttcg gtagatatcg acaccctgtt ccgatttggg | 300 |
| cgtggacgtg cgccgactgg cgaacctgcg gcggcagcgg aatgaccaa atggtttaac | 360 |
| accaactatc actacatggt gccggagttc gttaaaggcc aacagttcaa actgacctgg | 420 |
| acgcagctgc tggacgaagt ggacgaggcg ctggcgtggt gccacaaggt gaaacctgtg | 480 |
| ctgctggggc cggttacctg gctgtggctg gggaaagtga aaggtgaaca atttgaccgc | 540 |
| ctgagcctgc tgaacgacat tctgccggtt tatcagcaag tgctggcaga actggcgaaa | 600 |
| cgcgcatcg agtgggtaca gattgatgaa cccgcgctgg tactggaact accacaggcg | 660 |
| tggctggacg catacaaacc cgcttacgac gcgctccagg gacaggtgaa actgctgctg | 720 |
| accacctatt ttgaaggcgt aacgccaaat ctcgacacga ttactgcgct gcctgttcag | 780 |
| ggtctgcatg ttgacctcgt acatggtaaa gatgacgttg ctgaactgca caagcgctg | 840 |
| ccttctgact ggttgetgtc tgcgggtctg atcaatggtc gtaacgtctg gcgcgccgat | 900 |
| cttaccgaga aatatgcgca aattaaggac attgtcggca aacgtgattt gtgggtggca | 960 |
| tcttcctgct cgttgctgca cagccccatc gacctgagcg tggaaacgcg tcttgatgca | 1020 |
| gaagtgaaaa gctggtttgc cttcgcccta caaaaatgcc atgaactggc actgctgcgc | 1080 |
| gatgcgctga acagtgggta cacggcagct ctggcagagt ggagcgcccc gattcaggca | 1140 |
| cgtcgtcact ctaccgcgt acataatccg gcggtagaaa agcgtctggc ggcgatcacc | 1200 |
| gcccaggaca gccagcgtgc gaatgtctat gaagtgcgtg ctgaagccca gcgtgcgcgt | 1260 |
| tttaaactgc cagcgtggcc gaccaccacg attggttctt tcccgcaaac cacggaaatt | 1320 |

ES 2 632 170 T3

```

cgtaccctgc gtctggattt caaaaagggc aatctcgacg ccaacaacta ccgcacgggc      1380
attgcggaac atatcaagca ggccattggt gagcaggaac gtttgggact ggatgtgctg      1440
gtacatggcg aggccgagcg taatgacatg gtggaatact ttggcgagca cctcgacgga      1500
tttgtcttta cgcaaaacgg ttgggtacag agctacgggt cccgctgcgt gaagccaccg      1560
attgtcattg gtgacattag ccgcccggca ccgattaccg tggagtgggc gaagtatgcg      1620
caatcgctga ccgacaaacc ggtgaaaggg atgctgacgg gcccggtgac catactctgc      1680
tggtcgttcc cgcgtgaaga tgtcagccgt gaaacccatcg ccaaacagat tgcgctggcg      1740
ctgctgatg aagtggccga tctggaagcc gctggaattg gcatcatcca gattgacgaa      1800
ccggcgctgc gcgaagggtt accgctgcgt cgtagcgact gggatgcgta tctccagtgg      1860
ggcgtagagg ccttccgtat caacgccgcc gtggcgaaag atgacacaca aatccacact      1920
cacatgtgtt attgcgagtt caacgacatc atggattoga ttgcggcgct ggacgcagac      1980
gtcatcacca tcgaaacctc gcgttccgac atggagttgc tggagtcgtt tgaagagttt      2040
gattatccaa atgaaatcgg tcctggcgtc tatgacattc actcgcaaaa cgtaccgagc      2100
gtggaatgga ttgaagcctt gctgaagaaa gcggcaaaac gcattccggc agagcgccctg      2160
tgggtcaacc cggactgtgg cctgaaaacg cgcggctggc cagaaaccgg cgcggcactg      2220
gcgaacatgg tgcaggcggc gcagaacttg cgtcgggggt aa                          2262

```

<210> 21

< 211> 753

< 212> PRT

< 213> Escherichia coli

<400> 21

ES 2 632 170 T3

Met Thr Ile Leu Asn His Thr Leu Gly Phe Pro Arg Val Gly Leu Arg
1 5 10 15

Arg Glu Leu Lys Lys Ala Gln Glu Ser Tyr Trp Ala Gly Asn Ser Thr
 20 25 30

Arg Glu Glu Leu Leu Ala Val Gly Arg Glu Leu Arg Ala Arg His Trp
 35 40 45

Asp Gln Gln Lys Gln Ala Gly Ile Asp Leu Leu Pro Val Gly Asp Phe
 50 55 60

Ala Trp Tyr Asp His Val Leu Thr Thr Ser Leu Leu Leu Gly Asn Val
65 70 75 80

Pro Ala Arg His Gln Asn Lys Asp Gly Ser Val Asp Ile Asp Thr Leu
 85 90 95

ES 2 632 170 T3

Phe Arg Ile Gly Arg Gly Arg Ala Pro Thr Gly Glu Pro Ala Ala Ala
 100 105 110

Ala Glu Met Thr Lys Trp Phe Asn Thr Asn Tyr His Tyr Met Val Pro
 115 120 125

Glu Phe Val Lys Gly Gln Gln Phe Lys Leu Thr Trp Thr Gln Leu Leu
 130 135 140

Asp Glu Val Asp Glu Ala Leu Ala Leu Gly His Lys Val Lys Pro Val
 145 150 155 160

Leu Leu Gly Pro Val Thr Trp Leu Trp Leu Gly Lys Val Lys Gly Glu
 165 170 175

Gln Phe Asp Arg Leu Ser Leu Leu Asn Asp Ile Leu Pro Val Tyr Gln
 180 185 190

Gln Val Leu Ala Glu Leu Ala Lys Arg Gly Ile Glu Trp Val Gln Ile
 195 200 205

Asp Glu Pro Ala Leu Val Leu Glu Leu Pro Gln Ala Trp Leu Asp Ala
 210 215 220

Tyr Lys Pro Ala Tyr Asp Ala Leu Gln Gly Gln Val Lys Leu Leu Leu
 225 230 235 240

Thr Thr Tyr Phe Glu Gly Val Thr Pro Asn Leu Asp Thr Ile Thr Ala
 245 250 255

Leu Pro Val Gln Gly Leu His Val Asp Leu Val His Gly Lys Asp Asp
 260 265 270

Val Ala Glu Leu His Lys Arg Leu Pro Ser Asp Trp Leu Leu Ser Ala
 275 280 285

Gly Leu Ile Asn Gly Arg Asn Val Trp Arg Ala Asp Leu Thr Glu Lys
 290 295 300

Tyr Ala Gln Ile Lys Asp Ile Val Gly Lys Arg Asp Leu Trp Val Ala
 305 310 315 320

Ser Ser Cys Ser Leu Leu His Ser Pro Ile Asp Leu Ser Val Glu Thr
 325 330 335

Arg Leu Asp Ala Glu Val Lys Ser Trp Phe Ala Phe Ala Leu Gln Lys
 340 345 350

ES 2 632 170 T3

Cys His Glu Leu Ala Leu Leu Arg Asp Ala Leu Asn Ser Gly Asp Thr
 355 360 365
 Ala Ala Leu Ala Glu Trp Ser Ala Pro Ile Gln Ala Arg Arg His Ser
 370 375 380
 Thr Arg Val His Asn Pro Ala Val Glu Lys Arg Leu Ala Ala Ile Thr
 385 390 395 400
 Ala Gln Asp Ser Gln Arg Ala Asn Val Tyr Glu Val Arg Ala Glu Ala
 405 410 415
 Gln Arg Ala Arg Phe Lys Leu Pro Ala Trp Pro Thr Thr Thr Ile Gly
 420 425 430
 Ser Phe Pro Gln Thr Thr Glu Ile Arg Thr Leu Arg Leu Asp Phe Lys
 435 440 445
 Lys Gly Asn Leu Asp Ala Asn Asn Tyr Arg Thr Gly Ile Ala Glu His
 450 455 460
 Ile Lys Gln Ala Ile Val Glu Gln Glu Arg Leu Gly Leu Asp Val Leu
 465 470 475 480
 Val His Gly Glu Ala Glu Arg Asn Asp Met Val Glu Tyr Phe Gly Glu
 485 490 495
 His Leu Asp Gly Phe Val Phe Thr Gln Asn Gly Trp Val Gln Ser Tyr
 500 505 510
 Gly Ser Arg Cys Val Lys Pro Pro Ile Val Ile Gly Asp Ile Ser Arg
 515 520 525
 Pro Ala Pro Ile Thr Val Glu Trp Ala Lys Tyr Ala Gln Ser Leu Thr
 530 535 540
 Asp Lys Pro Val Lys Gly Met Leu Thr Gly Pro Val Thr Ile Leu Cys
 545 550 555 560
 Trp Ser Phe Pro Arg Glu Asp Val Ser Arg Glu Thr Ile Ala Lys Gln
 565 570 575
 Ile Ala Leu Ala Leu Arg Asp Glu Val Ala Asp Leu Glu Ala Ala Gly
 580 585 590
 Ile Gly Ile Ile Gln Ile Asp Glu Pro Ala Leu Arg Glu Gly Leu Pro

ES 2 632 170 T3

Met Thr Ile Leu Asn His Thr Leu Gly Phe Pro Arg Val Gly Leu Arg
 1 5 10 15

Arg Glu Leu Lys Lys Ala Gln Glu Ser Tyr Trp Ala Gly Asn Ser Thr
 20 25 30

Arg Glu Glu Leu Leu Ala Val Gly Arg Glu Leu Arg Ala Arg His Trp
 35 40 45

Asp Gln Gln Lys Gln Ala Gly Ile Asp Leu Leu Pro Val Gly Asp Phe
 50 55 60

Ala Trp Tyr Asp His Val Leu Thr Thr Ser Leu Leu Leu Gly Asn Val
 65 70 75 80

Pro Ala Arg His Gln Asn Lys Asp Gly Ser Val Asp Ile Asp Thr Leu
 85 90 95

Phe Arg Ile Gly Arg Gly Arg Ala Pro Thr Gly Glu Pro Ala Ala Ala
 100 105 110

Ala Glu Met Thr Lys Trp Phe Asn Thr Asn Tyr His Tyr Met Val Pro
 115 120 125

Glu Phe Val Lys Gly Gln Gln Phe Lys Leu Thr Trp Thr Lys Trp Thr
 130 135 140

Arg Arg Trp Arg Trp Ala Thr Arg
 145 150

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo recombinante optimizado para la producción fermentativa de metionina, en el que la actividad de la metionina sintasa independiente de cobalamina MetE se suprime y el gen *metH* se sobreexpresa en dicho microorganismo en comparación con un microorganismo no modificado.
2. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que la metionina sintasa independiente de cobalamina MetE es codificada por el gen *metE* del que se elimina al menos una porción.
- 10 3. El microorganismo según la reivindicación 2, en el que la eliminación del gen *metE* es una eliminación de las bases comprendidas entre las posiciones 417^a y 429^a.
- 15 4. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la expresión de al menos uno de los siguientes genes se está incrementada: *ptsG*, *pyc*, *pntAB*, *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *metF*, *thrA*, un alelo *metA* que codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina (*metA**), *thrA*, o un alelo *thrA* que codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina (*thrA**).
- 20 5. El microorganismo según la reivindicación 4, en el que al menos un gen está bajo el control de un promotor inducible.
6. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la expresión de al menos uno de los siguientes genes está atenuada: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *ybdL* o *yncA*.
7. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que:
- 25 a. el gen *metE* se elimina;
- b. la expresión de los genes *metA**, *metH*, *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP*, *metF*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *thrA** y *pyc* está potenciada; y
- c. la expresión de los genes *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU* y *yncA* está atenuada.
- 30 8. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho microorganismo es de la familia bacteriana *Enterobacteriaceae* o *Corynebacteriaceae*.
9. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho microorganismo es *Escherichia coli*.
- 35 10. Un método para la producción fermentativa de metionina que comprende las etapas:
- a. cultivar un microorganismo recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono fermentable y una fuente de azufre, y
- b. recuperar metionina o sus derivados del medio de cultivo.
- 40 11. El método según la reivindicación 10, en el que el crecimiento del microorganismo recombinante se somete a limitación o deficiencia en uno o varios sustratos inorgánicos, en particular fosfato y/o potasio, en el medio de cultivo.