

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 469**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2010** **PCT/EP2010/069473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011** **WO11073122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2010** **E 10803454 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017** **EP 2513322**

54 Título: **Uso de promotores inducibles en la producción de metionina**

30 Prioridad:

14.12.2009 WO PCT/IB2009/056033

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

27.09.2017

73 Titular/es:

EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen , DE

72 Inventor/es:

FIGGE, RAINER y
VASSEUR, PERRINE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 634 469 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

Uso de promotores inducibles en la producción de metionina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de promotores inducibles en la producción de metionina mediante fermentación.

Antecedentes de la invención

10 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 o piensos y productos farmacéuticos. En particular, la metionina, un aminoácido esencial, que no puede ser sintetizada por animales, representa un papel importante en muchas funciones corporales. Junto con 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 como un tratamiento para trastornos como alergia y fiebre reumática. No obstante, la mayoría de la metionina que se produce se añade a piensos.

15 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. Químicamente, la D,L-metionina se produce comúnmente a partir de acroleína, metilmercaptano y cianuro de hidrógeno. No obstante, la mezcla racémica no se comporta tan bien como la L-metionina pura, como por ejemplo en aditivos de pienso para pollos (Saunderson, C.L., (1985) British Journal of Nutrition 54, 621-633). La L-metionina pura se puede producir a partir de metionina racémica, p. ej. a través del
20 tratamiento con acilasa de N-acetil-D,L-metionina que incrementa drásticamente los costes de producción. La demanda creciente de L-metionina pura asociada a los problemas medioambientales hace atractiva la producción microbiana de metionina.

25 El uso de promotores inducibles en procedimientos biotecnológicos está dentro de la técnica de la biosíntesis química. Estos promotores responden habitualmente a estímulos químicos o físicos ejemplificados por propionato (documento WO2007005837), cinc (documento WO2004020640) y arabinosa (documento WO1998011231) o temperatura (Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of Escherichia coli. Tang X, Tan Y, Zhu H, Zhao K, Shen W. Appl Environ Microbiol. 2009 Mar; 75(6):1628-34.) y luz, respectivamente.

30 La producción de metionina se basa en varias rutas que proporcionan precursores. La producción eficaz de metionina requiere un ajuste fino de estas rutas. Para una producción máxima de metionina, puede ser beneficioso ser capaz de modular la expresión de ciertas enzimas clave durante el proceso. Por ejemplo (i) la expresión de ciertas enzimas solo se requiere durante la fase de producción y no durante la generación de la biomasa o viceversa. Otras enzimas solo son beneficiosas en fase estacionaria. Por lo tanto, el uso de promotores inducibles
35 puede ser de interés para mejorar el rendimiento global de la producción de metionina a escala industrial.

Sin embargo, debido a la complejidad de la ruta metabólica de metionina y al ajuste fino de estas rutas para una producción mejorada de metionina, nunca se ha considerado ni presentado el uso de promotores inducibles para controlar la expresión de genes implicados en la producción de metionina.

40 Los inventores han encontrado ahora que los promotores inducibles pueden ser beneficiosos cuando se usan para regular la expresión génica de genes implicados en rutas metabólicas complejas tales como la biosíntesis de metionina.

Breve descripción de la invención

45 La presente invención trata de un método para la producción de metionina, sus precursores o derivados en un proceso fermentativo que comprende las siguientes etapas:

- cultivar un microorganismo modificado en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno, y

- recuperar metionina y/o sus derivados del medio de cultivo,

50 en donde en dicho microorganismo modificado, la expresión de al menos los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina está bajo el control, directo o indirecto, de un promotor inducible por temperatura heterólogo inducido por la temperatura.

La invención también trata del microorganismo modificado para una producción mejorada de metionina en la que la expresión de al menos los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina está bajo el control, directo o indirecto, de un promotor inducible heterólogo inducible por temperatura inducido por la temperatura.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para la producción de metionina, sus precursores o derivados en un proceso fermentativo que comprende las siguientes etapas:

- cultivar un microorganismo modificado en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno, y

- 10 - recuperar metionina y/o sus derivados del medio de cultivo,

en donde en dicho microorganismo modificado, la expresión de al menos los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina está bajo el control, directo o indirecto, de un promotor inducible por temperatura heterólogo inducido por la temperatura.

- 15 Según la invención, los términos "proceso fermentativo", "fermentación" o "cultivo" se usan intercambiamente para indicar el crecimiento de bacterias en un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno.

- 20 Un "medio de cultivo apropiado" es un medio apropiado para el cultivo y el crecimiento del microorganismo. Estos medios son muy conocidos en la técnica de la fermentación de microorganismos, dependiendo del microorganismo que se vaya a cultivar.

- 25 El término "microorganismo" indica una bacteria, una levadura o un hongo. 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*.

- 30 El término "microorganismo modificado" es un microorganismo modificado para una producción mejorada de metionina e indica un microorganismo que se ha modificado genéticamente con el objetivo de mejorar el rendimiento de producción de metionina. Según la invención, "mejorado" o "mejorar" significa que la cantidad de metionina producida por el microorganismo, y particularmente el rendimiento de metionina (relación de metionina producida por fuente de carbono), es superior en el microorganismo modificado en comparación con el correspondiente microorganismo no modificado. Modificaciones habituales incluyen introducir supresión de genes en microorganismos mediante transformación y recombinación, sustituciones de genes e introducción de vectores para la expresión de genes heterólogos.

El microorganismo modificado usado en el método de la invención tiene ambas características:

- está modificado para una producción mejorada de metionina, y
- 40 - la expresión de al menos los genes implicados en la producción de metionina está bajo el control, directo o indirecto, de un promotor inducible por temperatura inducido por la temperatura.

La expresión "recuperar metionina y/o sus derivados del medio de cultivo" indica la acción de recuperar metionina, y posiblemente compuestos de S-acilmetionina y N-acilmetionina, tales como N-acetilmetionina y N-propionilmetionina, y todos los otros derivados obtenidos.

- 45 El término "promotor inducible por temperatura" indica un promotor cuya actividad se puede incrementar o disminuir con una inducción por temperatura.

La inducción del gen diana se puede obtener a través de la transmisión directa o indirecta del estímulo.

- 50 La transmisión directa se efectúa cuando la expresión de los genes diana está bajo el control del promotor inducible por temperatura.

- 55 La transmisión indirecta se puede efectuar al usar ARN-polimerasas heterólogas que están bajo el control del promotor inducible por temperatura y que reconocen promotores específicos que conducen la expresión de los genes diana implicados en la biosíntesis de metionina. En este caso, el promotor inducible por temperatura no está

directamente conectado al promotor de los genes diana, pero conduce la expresión de una ARN polimerasa que transcribe dicho promotor de los genes diana.

Estas ARN polimerasas heterólogas pueden ser, p. ej. ARN polimerasa de T3, ARN polimerasa de T7 u otra polimerasa conocida por el experto en la especialidad.

'Transmisión indirecta' también se refiere al 'efecto polar' de la expresión inducible de un gen específico sobre la expresión de sus genes vecinos. Un "efecto polar" indica la influencia de una modificación genética en un gen sobre la expresión de uno o más genes que están aguas debajo de dicho gen modificado.

En un aspecto específico de la invención, la inducción de genes específicos implicados en la producción de metionina puede conducir a una inducción de genes aguas debajo de dichos genes específicos.

La expresión "bajo el control de un promotor inducible por temperatura heterólogo" indica el hecho de que el promotor inducible por temperatura no es el promotor natural del gen y se introducía de un modo para controlar, al menos parcialmente, el nivel de expresión del gen que está conectado operablemente al mismo. La expresión de genes se puede activar o desactivar, según las necesidades del experto en la técnica.

En una realización específica de la invención, la expresión de al menos los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina está bajo el control directo de un promotor inducible por temperatura.

El promotor inducible por temperatura se regula preferentemente mediante un represor modificado del fago lambda, el promotor PR o un derivado de PR, el promotor PL o un derivado de PL (A genetic switch. Ptashne M. Blackwell Scientific, Cambridge, MA. 1986; A genetic switch: Phage lambda revisited. Ptashne M. Cold Spring Harbor Lab Press. Cold Spring Harbor, NY. 2004; The bacteriophages, Part II: Life of phages, 8. Gene regulatory circuitry of phage λ . Little J. 2ª edición 2004. Richard Calendar. ed. Oxford University Press) y un promotor lac modificado regulado por un represor Lac sensible a la temperatura.

El represor reprime la expresión desde el promotor cognado mediante la unión a sitios de unión específicos en la región promotora, limitando de ese modo el acceso de ARN polimerasa al promotor y reduciendo el inicio o el alargamiento de la transcripción. Ventajosamente, dicho represor es el alelo *cl857* del represor lambda (On a thermosensitive repression system in the Escherichia coli lambda bacteriophage. Sussman R, Jacob F. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 1962, 254, p1517) u otro alelo sensible a la temperatura del represor lambda *cl*.

En un aspecto específico de la invención, en el microorganismo modificado para la producción de metionina, se ha suprimido el gen que codifica *recA*. Se sabe que la proteína *RecA* actúa como una proteasa sobre *cl*. Por lo tanto, la supresión del gen que codifica *RecA* excluye la proteólisis del represor lambda *cl*.

El promotor inducible por temperatura se podría elegir ventajosamente entre el promotor PR o un derivado y el promotor PL o un derivado.

En otra realización, el promotor inducible por temperatura es un promotor lac modificado regulado por un represor Lac sensible a la temperatura.

Según un aspecto específico de la invención, la expresión de genes de interés está regulada a través de "transmisión indirecta", es decir, al menos los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina se transcribe mediante una ARN polimerasa heteróloga cuya expresión está bajo el control del promotor inducible por temperatura.

En una realización específica de la invención, la ARN polimerasa heteróloga se elige de polimerasa de T7, T3.

Según la invención, al menos los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina o la producción de sus precursores está bajo el control, directo o indirecto, de un promotor inducible por temperatura heterólogo; como se explica previamente, bien los genes están bajo el control directo de dicho promotor inducible, o bien los genes son transcritos por una ARN polimerasa inducible o ambas combinaciones.

Genes implicados en la producción de metionina en un microorganismo son conocidos en la técnica, 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 de consumo de metionina.

La producción eficaz de metionina requiere la optimización de la ruta específica de metionina y varias rutas que proporcionan precursores. Cepas productoras de metionina se han descrito en las solicitudes de patente WO 2005/111202, WO 2007/077041, WO 2009/043803 y WO 2009/043372 y se incorporan como referencia en esta solicitud.

Una cepa productora de metionina que sobreexpresa alelos de homoserina succiniltransferasa con reducción de la sensibilidad de retroalimentación a sus inhibidores SAM y metionina se describe en la solicitud de patente WO 2005/111202. Esta solicitud también describe la combinación de estos alelos con una supresión del represor de metionina MetJ (GenBank 1790373), responsable de la regulación a la baja del regulón de metionina como se sugería en la solicitud de patente JP 2000/157267. Además, combinaciones de las dos modificaciones con la sobreexpresión de aspartocinasa/homoserina deshidrogenasa se describen en la solicitud de patente WO 2005/111202.

La sobreexpresión de los genes *cysE*, *metH* y *metF* se ha sugerido en el documento WO 2007/077041.

Para incrementar la producción de metionina, al menos uno de los siguientes genes implicados en la producción de metionina también puede estar bajo el control de dicho promotor inducible.

a) La expresión de genes implicados en la asimilación de azufre puede estar ventajosamente bajo el control de un promotor inducible o de una ARN polimerasa:

gen	número de registro	función
<i>cysK</i>	1788754	cisteína sintasa
<i>cysZ</i>	g1788753	ORF aguas arriba de <i>cysK</i>
<i>cysN</i>	g1789108	ATP sulfurilasa
<i>cysD</i>	g1789109	sulfato adenililtransferasa
<i>cysC</i>	g1789107	adenililsulfato cinasa
<i>cysZ</i>	1788753	transporte de sulfato
<i>sbp</i>	1790351	Proteína de unión a sulfato periplásmica

b) Las reacciones anapleróticas pueden ser impulsadas al expresar los siguientes genes:

<i>ppc</i>	1790393	fosfoenolpiruvato carboxilasa
<i>pps</i>	1787994	fosfoenolpiruvato sintasa
<i>pyc</i>	CAB13359	piruvato carboxilasa (p. ej. de <i>B. subtilis</i>)

c) Las reacciones de consumo de acetato pueden ser impulsadas al sobreexpresar el gen:

<i>acs</i>	1790505	acetil-CoA sintetasa
------------	---------	----------------------

d) Enzimas directamente implicadas en la biosíntesis de metionina:

<i>metA</i>	1790443	homoserina O-transsuccinilasa
<i>metB</i>	1790375	cistationina gamma-sintasa
<i>metC</i>	1789383	cistationina beta-liasa
<i>metE</i>	2367304	5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína S-metiltransferasa
<i>metF</i>	1790377	5,10-metilentetrahidrofolato reductasa
<i>metH</i>	1790450	homocisteína-N5-metiltetrahidrofolato transmetilasa dependiente de B12,
<i>metK</i>	1789311	metionina adenosiltransferasa
<i>metL</i>	1790376	aspartocinasa II/homoserina deshidrogenasa II

e) Enzimas implicadas en el metabolismo de aspartato:

<i>asd</i>	1789841	aspartato-semialdehído deshidrogenasa
<i>aspC</i>	1787159	aspartato aminotransferasa
<i>lysC</i>	1790455	aspartocinasa III

La enzima ThrA o cualquiera de sus homólogos (*MetL*, *LysC*) cataliza reacciones en las transformación de aspartato en homoserina, un precursor de metionina. La enzima *CysE* cataliza la O-acetilación de serina para formar O-acetil-serina que es el precursor directo de cisteína que a su vez sirve como donante de azufre para la biosíntesis de metionina.

La producción de metionina se puede incrementar adicionalmente al usar un alelo de *metB* alterado que usa preferentemente o exclusivamente H₂S y así produce homocisteína a partir de O-succinil-homoserina según se describe en la solicitud de patente WO 2004/076659 que se incorpora en la presente mediante referencia.

- 5 El incremento adicional en la producción de metionina se puede obtener al atenuar la expresión de los genes *pykA*, *pykF* y/o *purU* según se describe en la solicitud de patente WO2009043803. Esto también se puede efectuar al usar un promotor inducible, directamente o indirectamente.

- 10 Esta solicitud también describe cepas productoras de metionina en las que los operones *cysPUWAM*, *cysJIH* y *gcvTHP* y los genes *serA*, *serB*, *serC*, *lpd* y *glyA* se sobreexpresan. De forma similar, esto se puede efectuar al usar un promotor inducible, directamente o indirectamente.

- 15 Por otra parte, la expresión de genes en rutas que degradan metionina (véase la lista posterior) o que se desvían de la ruta de producción de metionina se pueden atenuar usando un promotor inducible, directamente o indirectamente. La atenuación, en este contexto, describe la reducción de la actividad intracelular de una enzima mediante medidas tales como reducir su expresión, reducir la estabilidad de la enzima, incrementar su degradación y/u otras soluciones conocidas por el experto en la especialidad. Esto se puede efectuar al reducir la expresión del promotor inducible, es decir eliminar el estímulo que induce al promotor inducible o reducir la expresión de la ARN polimerasa inducible.

Gen	entrada del Genbank	actividad
<i>ackA</i>	1788633	acetato cinasa
<i>pta</i>	1788635	fosfotransacetilasa
<i>aceE</i>	1786304	piruvato deshidrogenasa E1
<i>aceF</i>	1786305	piruvato deshidrogenasa E2
<i>lpd</i>	1786307	piruvato deshidrogenasa E3
<i>sucC</i>	1786948	succinil-CoA sintetasa, subunidad beta
<i>sucD</i>	1786949	succinil-CoA sintetasa, subunidad alfa
<i>pck</i>	1789807	fosfoenolpiruvato carboxicinas
<i>maeB</i>		
<i>poxB</i>	1787096	piruvato oxidasa
<i>ilvB</i>	1790104	acetohidroxiácido sintasa I, subunidad grande
<i>ilvN</i>	1790103	acetohidroxiácido sintasa I, subunidad pequeña
<i>ilvG</i>	1790202	acetohidroxiácido sintasa II, subunidad grande
	1790203	
<i>ilvM</i>	1790204	acetohidroxiácido sintasa II, subunidad pequeña
<i>ilvI</i>	1786265	acetohidroxiácido sintasa III, subunidad grande
<i>ilvH</i>	1786266	acetohidroxiácido sintasa III, subunidad pequeña
<i>aroF</i>	1788953	DAHP sintetasa
<i>aroG</i>	1786969	DAHP sintetasa
<i>aroH</i>	1787996	DAHP sintetasa
<i>thrB</i>	1786184	homoserina cinasa
<i>thrC</i>	1786185	treonina sintasa
<i>sdaA</i>	1788116	serina desaminasa
<i>sdaB</i>	1789161	serina desaminasa
<i>speD</i>	1786311	S-adenosilmetionina descarboxilasa
<i>speC</i>	1789337	ornitina descarboxilasa
<i>astA</i>	1788043	arginina succiniltransferasa
<i>dapA</i>	1788823	dihidrodipicolinato sintasa
<i>mdh</i>	1789632	malato deshidrogenasa
<i>mgo</i>	1788539	malato deshidrogenasa, dominio de unión a FAD/NAD(P)
<i>glTA</i>	1786939	citrato sintasa

aceE	1786304	piruvato deshidrogenasa, E1
aceF	1786305	piruvato deshidrogenasa, E2

En una realización específica, los genes *thrA*, *cysE* y *metA* están bajo el control de un promotor inducible por temperatura, directamente o indirectamente. En una realización preferida de la invención, la expresión del gen *thrA* está bajo el control directo del promotor inducible por temperatura, y la expresión del gen *cysE* está bajo un 'efecto polar' de la expresión inducible del gen *thrA*. En otra realización preferida de la invención, la expresión del gen *thrA* está bajo el control directo del promotor inducible por temperatura, y las expresiones de los genes *cysE* y *metA* están bajo el 'efecto polar' de la expresión inducible del gen *thrA*.

En una realización específica, los tres genes *thrA*, *cysE* y *metA* están bajo el control del mismo promotor inducible por temperatura, tales como los divulgados anteriormente y en los ejemplos.

En la invención, "gen *thrA*" significa el gen *thrA* o alelos de *thrA* naturales con sensibilidad de retroalimentación reducida a treonina, tales como los descritos en el documento WO2005/108561. Según la invención, "gen *metA*" significa genes *metA* naturales o alelos mutantes de *metA* que codifican enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a metionina y S-adenosilmetionina, tales como los descritos en el documento WO2005/108561.

Los genes controlados por el promotor inducible bien pueden estar en su posición natural en el cromosoma o bien integrados en una posición no natural. Se pueden requerir una o varias integraciones del gen controlado por el promotor inducible para la producción óptima de metionina. De forma similar, se puede requerir una o varias copias del gen regulador para la expresión óptima. Se pueden usar diferentes relaciones de copias y promotores del gen represor para la expresión de ajuste fino.

Los genes bajo el control del promotor inducible por temperatura preferentemente están integrados en locus, cuya modificación no tiene un impacto negativo sobre la producción de metionina. Ejemplos para locus en los que se puede integrar el gen son:

Locus	Número de Registro	Función
aaaD	87081759	Pseudogén, homólogo de proteína A de terminasa fágica, fragmento N-terminal
aaaE	1787395	Pseudogén, homólogo de proteína A de terminasa fágica, fragmento C-terminal
afuB	1786458	Pseudogén, permeasa transportadora de la familia de ABC férrico; fragmento C-terminal
afuC	87081709	subunidad transportadora de ABC férrico predicha (componente que se une a ATP)
agaA	48994927	Pseudogén, fragmento C-terminal, GalNAc-6-P desacetilasa
agaW	1789522	Pseudogén, fragmento N-terminal, sistema de PTS EIICGalNAc
alpA	1788977	proteasa
appY	1786776	activador de la transcripción que se une a ADN
argF	1786469	ornitina carbamoiltransferasa
argU	ninguno	ARNt de arginina
argW	ninguno	ARNt(CCU) 5 de arginina
arpB	87081959	reconstrucción del pseudogén, repeticiones de anquirina
arrD	1786768	lisozima
arrQ	1787836	homólogo de proteína R de lisozima del fago lambda
arsB	87082277	transportador de arsenito
arsC	1789918	arsenato reductasa
arsR	1789916	represor de la transcripción que se une a ADN
beeE	1787397	Pseudogén, fragmento N-terminal, proteína portal
borD	1786770	homólogo de proteína Bor del bacteriófago lambda
cohE	1787391	represor similar a CI

croE	87081841	represor similar a Cro
cspB	1787839	proteína de choque por frío
cspF	1787840	homólogo de proteína de choque por frío
cspI	1787834	proteína de choque por frío
cybC	1790684	Pseudogén, fragmento N-terminal, citocromo b562
dicA	1787853	Regulador para dicB
dicB	1787857	Control de la división celular
dicC	1787852	Regulador para dicB
dicF	ninguno	ARNs antisentido de DicF
eaeH	1786488	Pseudogén, homólogo de intimina
efeU	87081821	Reconstrucción de pseudogén, ion ferroso permeasa
emrE	1786755	bomba de resistencia a múltiples fármacos
essD	1786767	proteína de lisis del fago predicha
essQ	87081934	homólogo de proteína de lisis del fago lambda S
exoD	1786750	Pseudogén, fragmento de exonucleasa C-terminal
eyeA	ninguno	nuevo ARNs, función desconocida
flu	48994897	Antígeno 43
flxA	1787849	desconocida
gapC	87081902	reconstrucción del pseudogén, GAP deshidrogenasa
gatR	87082039	reconstrucción del pseudogén, represor para el operón gat
glvC	1790116	reconstrucción del pseudogén
glvG	1790115	reconstrucción del pseudogén, 6-fosfo-beta-glucosidasa
gnsB	87081932	supresor de múltiples copias de secG(Cs) y fabA6(Ts)
gtrA	1788691	glucosa translocasa conectada a bactoprenol
gtrB	1788692	Bactoprenol glucosil transferasa
gtrS	1788693	glucosil transferasa
hokD	1787845	polipéptido membranario tóxico pequeño
icd	1787381	Isocitrato deshidrogenasa
icdC	87081844	pseudogén
ilvG	87082328	reconstrucción del pseudogén, acetohidroxiácido sintasa II
insA	1786204	gen IS1, función de transposición
insA	1786204	gen IS1, función de transposición
insB	1786203	secuencia de inserción IS1 transposasa
insB	1786203	secuencia de inserción IS1 transposasa
insC	1786557	gen IS2, función de transposición
insD	1786558	gen IS2, función de transposición
insD	1786558	gen IS2, función de transposición
insE	1786489	gen IS3, función de transposición
insF	1786490	gen IS3, función de transposición
insH	1786453	gen IS5, función de transposición
insH	1786453	gen IS5, función de transposición

insH	1786453	gen IS5, función de transposición
insI	1786450	gen IS30, función de transposición
insI(-1)	1786450	IS30 gene, función de transposición
insM	87082409	Pseudogén, IS600 transposasa truncada
insN	1786449	reconstrucción del pseudogén, IS911 transposasa ORFAB
insO	ninguno	reconstrucción del pseudogén, IS911 transposasa ORFAB
insX	87081710	Pseudogén, familia IS3 transposasa, fragmento N-terminal
insZ	1787491	reconstrucción del pseudogén, familia IS4 transposasa, en ISZ'
intA	1788974	gen de integrasa
intB	1790722	reconstrucción del pseudogén, integrasa similar a P4
intD	1786748	integrasa predicha
intE	1787386	e14 integrasa
intF	2367104	integrasa fágica predicha
intG	1788246	Pseudogén, homólogo de integrasa
intK	1787850	Pseudogén, fragmento de integrasa
intQ	1787861	Pseudogén, fragmento de integrasa
intR	1787607	gen de integrasa
intS	1788690	Integrasa
intZ	1788783	gen de integrasa putativo
isrC	ninguno	Nuevo ARNs, función desconocida
jayE	87081842	Pseudogén, fragmento C-terminal, placa base
kilR	87081884	función de destrucción del profago Rac
lafU	ninguno	Pseudogén, fragmento de proteína motriz flagelar lateral
lfhA	87081703	Pseudogén, fragmento de proteína de ensamblaje flagelar lateral
lit	1787385	peptidasa de muerte celular
lomR	1787632	reconstrucción del pseudogén, homólogo de lom; proteína de la membrana externa interrumpida por IS5Y, extremo N ausente
malS	1789995	α -amilasa
mcrA	1787406	proteína de unión a ADN específica de 5-metilcitosina
mdtQ	87082057	reconstrucción del pseudogén, familia OMF de bomba de fármacos lipoproteínicos
melB	1790561	melibiosa permeasa
mmuM	1786456	homocisteína metiltransferasa
mmuP	870811708	S-metilmetionina permeasa
mokA	ninguno	Pseudogén, péptido regulador solapado, permite hokB
ninE	1786760	desconocida
nmpC	1786765	reconstrucción del pseudogén, porina de OM, interrumpida por IS5B
nohD	1786773	proteína de empaquetamiento de ADN
nohQ	1787830	Pseudogén, homólogo Nu1 del fago lambda, familia de subunidad pequeña de terminasa, proteína de empaquetamiento de ADN putativa
ogrK	1788398	regulador positivo del crecimiento de P2
ompT	1786777	proteasa VII de la membrana externa
oweE	ninguno	Pseudogén, homólogo de proteína O de replicación de lambda

oweS	1788700	Pseudogén, homólogo de proteína O de replicación de lambda
pauD	ninguno	pseudogén argU, sitio de ligación al profago DLP12
pawZ	ninguno	sitio de ligación al profago CPS-53 attR, pseudogén argW
pbl	87082169	reconstrucción del pseudogén, homólogo de pilT
peaD	87081754	Pseudogén, familia de proteína P de replicación del fago lambda; fragmento C-terminal
perR	1786448	regulador de la transcripción que se une a ADN predicho
pgaA	1787261	porina de membrana externa de la ruta de poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA)
pgaB	1787260	PGA N-desacetilasa
pgaC	1787259	UDP-N-acetil-D-glucosamina β -1,6-N-acetil-D-glucosaminil transferasa
pgaD	1787258	proteína de membrana interna predicha
phnE	87082370	reconstrucción del pseudogén, fosfonato permeasa
pinE	1787404	ADN invertasa
pinH	1789002	Pseudogén, ADN invertasa, recombinación específica del sitio
pinQ	1787827	ADN invertasa
pinR	1787638	ADN invertasa
prfH	1786431	Pseudogén, homólogo de factor de liberación de proteína
psaA	ninguno	pseudogén ssrA, duplicación del sitio de ligación a CP4-57
ptwF	ninguno	pseudogén thrW, sitio de ligación al profago CP4-6
quuD	1786763	proteína antiterminación predicha
quuQ	87081935	homólogo de proteína antiterminación de lambda Q
racC	1787614	desconocida
racR	1787619	represor del profago Rac, similar a cl
ralR	1787610	gen de alivio de la restricción
rbsA	1790190	subunidad transportadora de ABC de D-ribosa (componente que se une a ATP)
rbsD	87082327	D-ribosa piranasa
recE	1787612	RecET recombinasa
recT	1787611	RecET recombinasa
relB	1787847	Antitoxina para RelE
relE	1787846	ARNm endorribonucleasa específica de secuencia
rem	1787844	desconocida
renD	87081755	reconstrucción del pseudogén, homólogo de lambda ren, interrumpido por IS3C; activador putativo de la transcripción de lit
rhsE	1787728	Pseudogén, familia rhs, codificado dentro de la repetición RhsE
rnIA	1788983	RNasa LS, endorribonucleasa
rph	1790074	reconstrucción del pseudogén, RNasa PH
rusA	1786762	Endonucleasa
rzoD	87081757	Probable lipoproteína similar a Rz1
rzoQ	ninguno	Probable lipoproteína similar a Rz1
rzoR	87081890	Probable lipoproteína similar a Rz1
rzpD	1786769	mureína endopeptidasa predicha
rzpQ	1787835	equivalente similar a Rz
rzpR	87081889	Pseudogén, homólogo de Rz

sieB	87081885	proteína de exclusión de superinfección
sokA	ninguno	Pseudogén, ARNs antisentido que bloquea la traducción de mokA/hokA
stfE	87081843	casete variable Stf C-terminal, proteína de especificidad virión-hospedador alterna; dominio del collar de la cola, pseudogén
stfP	1787400	proteína de fibra de la cola predicha
stfR	87081892	proteína de la fibra de la cola lateral
tfaD	87081759	Pseudogén, gen de ensamblaje de la fibra de la cola, fragmento C-terminal
tfaE	1787402	gen de ensamblaje de la fibra de la cola predicho
tfaP	1787401	gen de ensamblaje de la fibra de la cola predicho
tfaQ	2367120	homólogo del gen de ensamblaje de la fibra de la cola del fago lambda
tfaR	1787637	homólogo del gen de ensamblaje de la fibra de la cola del fago lambda
tfaS	87082088	Pseudogén, gen de ensamblaje de la fibra de la cola, fragmento C-terminal
tfaX	2367110	reconstrucción del pseudogén, gen de ensamblaje de la fibra de la cola, fragmento C-terminal
thrW	ninguno	ARNt de treonina (sitio de ligación del profago CP4-6)
torI	87082092	CPS-53/KpLE1 exisionasa
treB	2367362	subunidad de trehalosa PTS permeasa (dominios IIB/IIC)
treC	1790687	trehalosa-6-fosfato hidrolasa
trkG	1787626	permeasa de captación de K ⁺ constitutiva principal
ttcA	1787607	gen de integrasa
ttcC	ninguno	Pseudogén, duplicación de sitio ttcA de integración del profago Rac
uidB	1787902	Glucurónido permeasa, mutante puntual inactivo
uxaA	1789475	altronato hidrolasa
uxaC	2367192	uronato isomerasa
wbbL	1788343	reconstrucción del pseudogén, ramnosil transferasa
wcaM	1788356	proteína de biosíntesis de ácido colánico predicha
xisD	ninguno	Pseudogén, fragmento de exisionasa en profago DLP12 defectuoso
xisE	1787387	e14 excisionasa
yabP	1786242	reconstrucción del pseudogén
yafF	87081701	Pseudogén, fragmento C-terminal, proteína asociada a la repetición H
yafU	1786411	Pseudogén, fragmento C-terminal
yafW	1786440	antitoxina del sistema toxina-antitoxina Ykfl-YafW
yafX	1786442	desconocida
yafY	1786445	regulador de la transcripción que se une a ADN predicho; lipoproteína de la membrana interna
yafZ	87081705	desconocida
yagA	1786462	regulador de la transcripción que se une a ADN predicho
yagB	87081711	Pseudogén, relacionado con antitoxina, fragmento N-terminal
yagE	1786463	liasa/sintasa predicha
yagF	1786464	<u>deshidratasa predicha</u>
yagG	1786466	simportador sacárico putativo
yagH	1786467	β -xilosidasa putativa

yagI	1786468	regulador de la transcripción que se une a ADN predicho
yagJ	1786472	desconocida
yagK	1786473	desconocida
yagL	1786474	proteína que se une a ADN
yagM	2367101	desconocida
yagN	2367102	desconocida
yagP	1786476	Pseudogén, familia LysR, fragmento
yaiT	1786569	reconstrucción del pseudogén, familia de autotransportadores
yaiX	87082443	reconstrucción del pseudogén, interrumpida por IS2A
ybbD	1786709	reconstrucción del pseudogén, nueva familia conservada
ybcK	1786756	recombinasa predicha
ybcL	1786757	inhibidor de cinasa predicho
ybcM	1786758	regulador de la transcripción que se une a ADN predicho
ybcN	1786759	proteína de volteo de bases de ADN
ybcO	1786761	desconocida
ybcV	87081758	desconocida
ybcW	1786772	desconocida
ybcY	48994878	reconstrucción del pseudogén, familia de metiltransferasas
ybeM	1786843	reconstrucción del pseudogén, CN hidrolasa putativa
ybfG	87081771	reconstrucción del pseudogén, nueva familia conservada
ybfI	ninguno	reconstrucción del pseudogén, homólogo de KdpE
ybfL	87081775	reconstrucción del pseudogén, proteína asociada a la repetición H
ybfO	1786921	Pseudogén, copia de núcleo Rhs con extensión única
ycgH	87081847	reconstrucción del pseudogén
ycgI	1787421	reconstrucción del pseudogén, homólogo de autotransportador
ycjV	1787577	reconstrucción del pseudogén, parálogo de malK
ydaC	1787609	desconocida
ydaE	87081883	metalotioneína
ydaF	87081886	desconocida
ydaG	87081887	desconocida
ydaQ	87081882	exisionasa putativa
ydaS	1787620	desconocida
ydaT	1787621	desconocida
ydaU	1787622	desconocida
ydaV	1787623	desconocida
ydaW	87081888	Pseudogén, fragmento N-terminal
ydaY	1787629	pseudogén
ydbA	87081898	reconstrucción del pseudogén, homólogo de autotransportador
yddK	1787745	Pseudogén, fragmento C-terminal, rico en leucina
yddL	1787746	Pseudogén, familia de porina de OmpCFN, fragmento N-terminal
ydeT	1787782	Pseudogén, familia FimD, fragmento C-terminal

ydfA	1787854	desconocida
ydfB	87081937	desconocida
ydfC	1787856	desconocida
ydfD	1787858	desconocida
ydfE	1787859	Pseudogén, fragmento N-terminal
ydfJ	1787824	reconstrucción del pseudogén, familia MFS
ydfK	1787826	gen de choque por frío
ydfO	87081931	desconocida
ydfR	1787837	desconocida
ydfU	87081936	desconocida
ydfV	1787848	desconocida
ydfX	1787851	pseudogén
yedN	87082002	reconstrucción del pseudogén, familia IpaH/YopM
yedS	87082009	reconstrucción del pseudogén, homólogo de proteína de la membrana externa
yeeH	ninguno	Pseudogén, fragmento interno
yeeL	87082016	reconstrucción del pseudogén, familia de glicosiltransferasa
yeeP	87082019	Pseudogén, proteína que se une a GTP putativa
yeeR	87082020	desconocida
yeeS	1788312	desconocida
yeeT	1788313	desconocida
yeeU	1788314	componente de antitoxina del par de proteínas de toxina-antitoxina YeeV-YeeU
yeeV	1788315	componente de toxina del par de proteínas de toxina-antitoxina YeeV-YeeU
yeeW	1788316	pseudogén
yegZ	ninguno	Pseudogén, proteína D similar al fago P2 de gpD; fragmento C-terminal
yehH	87082046	reconstrucción del pseudogén
yehQ	87082050	reconstrucción del pseudogén
yejO	1788516	reconstrucción del pseudogén, homólogo de autotransportador
yfaH	1788571	reconstrucción del pseudogén, fragmento C-terminal, homólogo de LysR
yfaS	87082066	reconstrucción del pseudogén
yfcU	1788678	reconstrucción del pseudogén, familia FimD
yfdK	1788696	desconocida
yfdL	1788697	Pseudogén, proteína de fibra de la cola
yfdM	87082089	Pseudogén, el gen intacto codifica una ADN adenina metiltransferasa predicha
yfdN	1788699	desconocida
yfdP	1788701	desconocida
yfdQ	1788702	desconocida
yfdR	87082090	desconocida
yfdS	1788704	desconocida
yfdT	1788705	desconocida
yffL	1788784	desconocida
yffM	1788785	desconocida

yffN	1788786	desconocida
yffO	1788787	desconocida
yffP	1788788	desconocida
yffQ	1788790	desconocida
yffR	1788791	desconocida
yffS	1788792	desconocida
yfjH	1788976	desconocida
yfjI	1788978	desconocida
yfjJ	1788979	desconocida
yfjK	1788980	desconocida
yfjL	1788981	desconocida
yfjM	1788982	desconocida
yfjO	87082140	desconocida
yfjP	48994902	desconocida
yfjQ	1788987	desconocida
yfjR	1788988	desconocida
yfjS	87082142	desconocida
yfjT	1788990	desconocida
yfjU	1788991	pseudogén
yfjV	1788992	reconstrucción del pseudogén, fragmento similar a arsB C-terminal
yfjW	2367146	desconocida
yfjX	1788996	desconocida
yfjY	1788997	desconocida
yfjZ	1788998	componente de antitoxina de toxina-antitoxina YpjF-YfjZ putativa
ygaQ	1789007	reconstrucción del pseudogén, tiene dominio relacionado con alfa-amilasa
ygaY	1789035	reconstrucción del pseudogén, familia MFS
ygeF	2367169	reconstrucción del pseudogén, parte de T3SS PAI ETT2 remanente
ygeK	87082170	reconstrucción del pseudogén, parte de T3SS PAI ETT2 remanente
ygeN	1789221	reconstrucción del pseudogén, homólogo de orgB
ygeO	1789223	Pseudogén, homólogo de orgA, parte de T3SS PAI ETT2 remanente
ygeQ	1789226	reconstrucción del pseudogén, parte de T3SS PAI ETT2 remanente
yghE	1789340	reconstrucción del pseudogén, familia de proteínas de secreción general
yghF	1789341	Pseudogén, proteína de secreción general
yghO	1789354	Pseudogén, fragmento C-terminal
yghX	1789373	reconstrucción del pseudogén, familia de S9 peptidasa
yhcE	1789611	reconstrucción del pseudogén, interrumpida por IS5R
yhdW	1789668	reconstrucción del pseudogén
yhiL	87082275	reconstrucción del pseudogén, regulada por FliA
yhiS	1789920	reconstrucción del pseudogén, interrumpida por IS5T
yhjQ	1789955	reconstrucción del pseudogén
yibJ	48994952	reconstrucción del pseudogén, familia Rhs

yibS	ninguno	reconstrucción del pseudogén, familia Rhs, fragmento C-terminal
yibU	ninguno	reconstrucción del pseudogén, proteína asociada a la repetición H
yibW	ninguno	reconstrucción del pseudogén, conectada a rhsA
yicT	ninguno	Pseudogén, fragmento N-terminal
yifN	2367279	reconstrucción del pseudogén
yjbl	1790471	reconstrucción del pseudogén
yjdQ	ninguno	reconstrucción del pseudogén, integrasa similar a P4 remanente
yjgX	1790726	reconstrucción del pseudogén, familia EptAB
yjhD	87082406	Pseudogén, fragmento C-terminal
yjhE	87082407	Pseudogén, transportador putativo remanente
yjhR	1790762	reconstrucción del pseudogén, familia de helicasa, fragmento C-terminal
yjhV	1790738	Pseudogén, fragmento C-terminal
yjhY	ninguno	reconstrucción del pseudogén, nueva familia de dedo de cinc
yjhZ	ninguno	reconstrucción del pseudogén, parálogo de rimK, fragmento C-terminal
yjiP	1790795	reconstrucción del pseudogén, familia de transposasa
yjiT	87082428	Pseudogén, fragmento N-terminal
yjiV	ninguno	reconstrucción del pseudogén, similar a helicasa, fragmento C-terminal
yjiN	87082432	oxidorreductasa predicha
ykfA	87081706	proteína que se une a GTP putativa
ykfB	1786444	desconocida
ykfC	87081707	Pseudogén, familia de transcriptasa inversa tipo retrón, fragmento N-terminal
ykfF	1786443	desconocida
ykfG	2367100	desconocida
ykfH	87081704	desconocida
ykfl	1786439	toxina del sistema toxina-antitoxina Ykfl-YafW
ykfJ	1786430	Pseudogén, fragmento N-terminal
ykfK	1786445	Pseudogén, fragmento N-terminal
ykfL	ninguno	Pseudogén, fragmento C-terminal
ykfN	ninguno	Pseudogén, N-terminal remanente, familia YdiA
ykgA	87081714	Pseudogén, fragmento N-terminal, familia AraC
ykgP	ninguno	Pseudogén, fragmento de oxidorreductasa
ykgQ	ninguno	Pseudogén, fragmento C-terminal de una deshidrogenasa putativa
ykgS	ninguno	fragmento interno de pseudogén
ykiA	1786591	reconstrucción del pseudogén, fragmento C-terminal
yibE	1786730	reconstrucción del pseudogén, parálogo de yahG
yibG	87081748	reconstrucción del pseudogén, fragmento N-terminal discontinuo
yibH	1786708	Pseudogén, copia de núcleo de Rhs con extensión única
yibl	ninguno	Pseudogén, fragmento interno, familia Rhs
ylcG	87081756	desconocida
ylcH	ninguno	desconocida
ylcl	ninguno	desconocida

ymdE	87081823	Pseudogén, fragmento C-terminal
ymfD	1787383	metiltransferasa dependiente de SAM putativa
ymfE	1787384	desconocida
ymfI	87081839	desconocida
ymfJ	87081840	desconocida
ymfL	1787393	desconocida
ymfM	1787394	desconocida
ymfQ	1787399	proteína tt de placa base o fibra de cola putativa
ymfR	1787396	desconocida
ymjC	ninguno	Pseudogén, fragmento N-terminal
ymjD	ninguno	proteína remanente de fusión de pseudogén de supresión expresado
ynaA	1787631	Pseudogén, fragmento N-terminal
ynaE	1787639	gen de choque por frío
ynaK	1787628	desconocida
yncl	1787731	reconstrucción del pseudogén, asociado a la repetición H, conectado a RhsE
ynck	ninguno	reconstrucción del pseudogén, homólogo de transposasa
yneL	1787784	reconstrucción del pseudogén, fragmento C-terminal, familia AraC
yneO	1787788	reconstrucción del pseudogén, adhesina autotrasportadora de OM putativa
ynfN	87081933	gen de choque por frío
ynfO	ninguno	desconocida
yoE	87082018	reconstrucción del pseudogén, interrumpido por IS2F
yoE	ninguno	Pseudogén, fragmento C-terminal de una transposasa putativa
yoE	87082021	Pseudogén, fragmento C-terminal
yoE	ninguno	pseudogén, fragmento N-terminal
yoE	ninguno	pseudogén, fragmento C-terminal
ypdJ	87082091	Pseudogén, fragmento de exonasa
ypjC	1789003	reconstrucción del pseudogén
ypjF	1788999	componente de toxina del par toxina-antitoxina YpjF-YfjZ putativo
ypjI	ninguno	reconstrucción del pseudogén
ypjJ	87082144	desconocida
ypjK	87082141	desconocida
yqfE	1789281	reconstrucción del pseudogén, fragmento C-terminal, familia LysR
yqiG	48994919	reconstrucción del pseudogén, familia FimD, interrumpida por IS2I
yrdE	ninguno	reconstrucción del pseudogén, fragmento C-terminal, parálogo de yedZ
yrdF	ninguno	Pseudogén, fragmento N-terminal
yrhA	87082266	reconstrucción del pseudogén, interrumpida por IS1E
yrhC	87082273	reconstrucción del pseudogén, fragmento N-terminal
ysaC	ninguno	Pseudogén, C-terminal remanente
ysaD	ninguno	Pseudogén, secuencia interna remanente
ytfA	1790650	Pseudogén, fragmento C-terminal
yzgL	87082264	Pseudogén, proteína que se une a soluto periplásmico putativa

En la descripción de la presente invención, los genes y las proteínas se identifican usando las denominaciones de los genes correspondientes en *E. coli*. Sin embargo, y a menos que se especifique otra cosa, el uso de estas denominaciones tiene un significado más general según la invención y cubre todos los genes y las proteínas correspondientes en otros organismos, más particularmente microorganismos.

Usando las referencias dadas en GenBank para genes conocidos, los expertos en la técnica 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 técnica y se reivindican, por ejemplo, en Sambrook y cols. (1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2ª ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Nueva York.)

PFAM (base de datos de alineamientos por familias de proteínas y modelos de Markov ocultos; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) representa una gran colección de alineamientos de secuencias proteínicas. Cada PFAM hace posible visualizar múltiples alineamientos, observar dominios proteínicos, evaluar la distribución entre organismos, obtener acceso a otras bases de datos y visualizar estructuras proteínicas conocidas.

COGs (agregados de grupos ortólogos de proteínas; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen al comparar secuencias proteínicas procedentes de genomas completamente secuenciados que representan líneas filogénicas principales. Cada COG se define a partir de al menos tres líneas, lo que permite la identificación de dominios conservados previos.

Los medios para identificar secuencias homólogas y su porcentaje de homología son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen en particular los programas BLAST, que se pueden usar del ciber sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros por defecto indicados en ese ciber sitio. A continuación, las secuencias obtenidas se pueden explotar (p. ej, alinear) usando, por ejemplo, los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) o MULTALIN (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>), con los parámetros por defecto indicados en esos ciber sitios.

El método para la producción de metionina, sus precursores o derivados en un proceso fermentativo, es muy conocido por el experto en la técnica. Diferentes factores del proceso fermentativo se pueden modular para la optimización del proceso, tales como la elección de la fuente de azufre, de la fuente de carbono y de la fuente de nitrógeno.

En un aspecto preferido de la invención, la fuente de azufre usada para la producción fermentativa de L-metionina, añadida al medio de cultivo, es sulfato, tiosulfato, sulfuro de hidrógeno, ditionato, ditionito, sulfito, metilmercaptano, disulfuro 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.

El término 'fuente de carbono', según la presente invención, indica cualquier fuente de carbono que pueda ser usada por los expertos en la técnica para apoyar el crecimiento normal de un microorganismo, que puede ser hexosas (tales como glucosa, galactosa o lactosa), pentosas, monosacáridos, disacáridos (tales como sacarosa, celobiosa o maltosa), oligosacáridos, melazas, almidón o sus derivados, hemicelulosas, glicerol y combinaciones de los mismos. Una fuente de carbono especialmente preferida es la glucosa. Otra fuente de carbono preferida es la sacarosa.

En una realización particular de la invención, la fuente de carbono se deriva de una materia prima renovable. Una materia prima renovable se define como un material de partida requerido para ciertos procedimientos industriales que se puede regenerar en poco tiempo y en una cantidad suficiente para permitir su transformación en el producto deseado.

El término fuente de nitrógeno corresponde bien a una sal amónica o bien a amoníaco gaseoso.

La fuente de nitrógeno se suministra en la forma de amonio o amoníaco.

La fermentación se efectúa generalmente en fermentadores con un medio de cultivo apropiado adaptado al microorganismo que se use, que contiene al menos una fuente de carbono simple, y si es necesario cosustratos para la producción de metabolitos.

Los expertos en la técnica 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*.

Como un ejemplo de un medio de cultivo conocido para *E. coli*, el medio de cultivo puede ser de composición idéntica o similar a un medio M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **32**:120-128), un medio M63 (Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) o un medio tal como el definido por Schaefer y cols. (1999, *Anal. Biochem.* **270**: 88-96).

Como un ejemplo de un medio de cultivo conocido para *C. glutamicum*, el medio de cultivo puede ser de composición idéntica o similar a medio BMCG (Liebl y cols., 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 205-210) o a un medio tal como el descrito por Riedel y cols. (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 573-583).

La presente invención también se refiere a un método para la producción de metionina, que comprende la etapa de aislamiento de metionina, sus precursores o derivados, del caldo de fermentación y/o la biomasa, opcionalmente en porciones o en la cantidad total (0-100%) en el producto final.

En un aspecto específico de la invención, el cultivo se realiza en tales condiciones que el microorganismo esté limitado o en ayunas con respecto a un sustrato inorgánico, en particular fosfato y/o potasio.

Someter a un organismo a una limitación de un sustrato inorgánico define una condición bajo la cual el crecimiento de los microorganismos está gobernado por la cantidad de un producto químico inorgánico suministrado que permita todavía un crecimiento débil.

Someter a ayuno a un microorganismo con respecto a un sustrato inorgánico define la condición bajo la cual el crecimiento del microorganismo se detiene completamente debido a la ausencia del sustrato inorgánico.

La presente invención también se refiere a un microorganismo que comprende al menos los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina está bajo el control, directo o indirecto, de un promotor inducible por temperatura heterólogo inducido por la temperatura.

Ejemplos

Ejemplo I: Construcción de la cepa MG1655 *metA**11 *P*_{trc}-*metH* *P*_{trc}F-*cysPUWAM* *P*_{trc}F-*cysJIH* *P*_{trc}09-*gcvTHP* *P*_{trc}36-*ARNmst17-metF* *DmetJ* *DpykF* *DpykA* *DpurU* *DyncA* *P*_{trc}07-*serB* (*pCC1BAC-serA-serC*) (*pCL1920-TTadC-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11*)

Cepas productoras de metionina con acumulación reducida de N-acetilmetionina se han descrito en las solicitudes de patente WO2007077041 y WO2009043803 que se incorporan como referencia en esta solicitud.

1. Construcción de la cepa MG1655 *metA**11 *P*_{trc}-*metH* *P*_{trc}F-*cysPUWAM* *P*_{trc}F-*cysJIH* *P*_{trc}09-*gcvTHP* *P*_{trc}36-*ARNmst17-metF* *DmetJ* *DpykF* *DpykA* *DpurU* *DyncA* *P*_{trc}07-*serB::Km*.

Para incrementar el nivel de fosfoserina fosfatasa, *SerB*, un promotor *trc* artificial constitutivo, se añadió aguas arriba del gen *serB* en la cepa MG1655 *metA**11 *P*_{trc}-*metH* *P*_{trc}F-*cysPUWAM* *P*_{trc}F-*cysJIH* *P*_{trc}09-*gcvTHP* *P*_{trc}36-*ARNmst17-metF* *DmetJ* *DpykF* *DpykA* *DpurU* *DyncA*.

Para añadir este promotor *trc* artificial, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a kanamicina, pero también una región de ADN adicional, específicamente en cromosoma. Con este propósito, se usaron dos oligonucleótidos, *P*_{trc}07-*serBF* (SEQ ID N°01) y *P*_{trc}07-*serBR* (SEQ ID N°02) (secuencia de referencia en el ciber sitio <http://ecogene.org/>).

*P*_{trc}07-*serBF* (SEQ ID N°01)

CCACCCTTTGAAAATTTGAGACTTAATGTTGCCAGAAGCAATGGATACAAGGT
AGCCTCATGCTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCCATATGAAT
ATCCTCCTTAG

con

- una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia de 4622816 a 4622878 de la región del gen *serB*,

- una región (mayúsculas subrayado) para la secuencia terminadora de la transcripción T7Te procedente del fago T7 (Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci USA. 24 abr. 2001;98(9):5019-24.),

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

5 Ptrc07-serBR (SEQ ID N°02)

CGCACCAGGTAATGTTAGGCATTAAGGCTCCTGTAAAATCGTTTGAAGCAGGG
AAAATAACTTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATCGCCAACAGCTTGTAGG
CTGGAGCTGCTTCG

con

- una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia de 4622939 a 4622879 de la región del gen *serB*,

- una región (mayúsculas cursiva) para la secuencia del promotor *trc*,

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

Los oligonucleótidos Ptrc07-serBF (SEQ ID N°01) y Ptrc07-serBR (SEQ ID N°02) se usaron para amplificar el casete de resistencia a kanamicina procedente del plásmido pKD4. A continuación, el producto de PCR obtenido se introdujo mediante electroporación en la cepa MG1655 *metA**11 *P**trc-metH* *P**trcF-cysPUWAM* *P**trcF-cysJIH* *P**trc09-gcvTHP* *P**trc36-ARNmst17-metF* *D**metJ* *D**pykF* *D**pykA* *D**purU* *D**yncA* (pKD46), en la que la enzima Red recombinasa expresada permite la recombinación homóloga. A continuación, se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina, y la inserción del casete de resistencia se verificó mediante un análisis por PCR con los oligonucleótidos *serBF* (SEQ ID N°03) y *serBR* (SEQ ID N°04) definidos posteriormente. A continuación, los transformantes seleccionados se verificaron mediante secuenciación de ADN.

20 La cepa retenida se denominó MG1655 *metA**11 *P**trc-metH* *P**trcF-cysPUWAM* *P**trcF-cysJIH* *P**trc09-gcvTHP* *P**trc36-ARNmst17-metF* *D**metJ* *D**pykF* *D**pykA* *D**purU* *D**yncA* *P**trc07-serB*::Km.

serBF (SEQ ID N°03)

CAAGGCAAGACAGAACAGG (homóloga a la secuencia de 4622747 a 4622765 de la región del gen *serB*).

25 *serBR* (SEQ ID N°04)

GGCATCACTTCATCACCAC (homóloga a la secuencia de 4623006 a 4622988 de la región del gen *serB*).

2. Construcción de la cepa MG1655 *metA**11 *P**trc-metH* *P**trcF-cysPUWAM* *P**trcF-cysJIH* *P**trc09-gcvTHP* *P**trc36-ARNmst17-metF* *D**metJ* *D**pykF* *D**pykA* *D**purU* *D**yncA* *P**trc07-serB*

Posteriormente, se eliminó el casete de resistencia a kanamicina. El plásmido pCP20, que soporta recombinasa FLP que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a kanamicina, se introdujo en la cepa recombinante MG1655 *metA**11 *P**trc-metH* *P**trcF-cysPUWAM* *P**trcF-cysJIH* *P**trc09-gcvTHP* *P**trc36-ARNmst17-metF* *D**metJ* *D**pykF* *D**pykA* *D**purU* *D**yncA* *P**trc07-serB*::Km mediante electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, la pérdida del casete de resistencia a kanamicina se verificó mediante análisis por PCR con los mismos oligonucleótidos que los usados previamente, *serBF* (SEQ ID N°03) / *serBR* (SEQ ID N°04). La cepa retenida se denominó MG1655 *metA**11 *P**trc-metH* *P**trcF-cysPUWAM* *P**trcF-cysJIH* *P**trc09-gcvTHP* *P**trc36-ARNmst17-metF* *D**metJ* *D**pykF* *D**pykA* *D**purU* *D**yncA* *P**trc07-serB*.

3. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA Ptrc07-serB* (pCC1BAC-serA-serC)

La construcción del vector pCC1BAC-serA-serC se ha descrito en el documento WO2009043803.

- 5 El vector pCC1BAC-serA-serC se introdujo mediante electroporación en la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA Ptrc07-serB* dando la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA Ptrc07-serB* (pCC1BAC-serA-serC).

- 10 4. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA Ptrc07-serB* (pCC1BAC-serA-serC) (pCL1920-TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11)

El plásmido pCL1920-TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 se deriva de los plásmidos pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15 p 4631), pME101-thrA*1-cysE y pFC1 (Mermet-Bouvier & Chauvat, 1994, Current Microbiology, vol. 28, pp 145-148).

- 15 La construcción de pME101-thrA*1-cysE se describió en el documento WO2007077041.

- 20 Para la construcción del plásmido pCL1920-TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11, TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE y las regiones PgapA-metA*11 se obtuvieron individualmente mediante PCR de solapamiento y a continuación se clonaron conjuntamente en el vector pCL1920.

- En primer lugar, la región TTadc-CI857-PlambdaR*(-35) se amplificó por PCR a partir del vector pFC1 al usar los siguientes oligonucleótidos, Apal-TTadc-CI857-F-1 (SEQ ID N°05) y PlambdaR-thrA-R-2 (SEQ ID N°06) (secuencia de referencia en el cbersitio <http://ecogene.org/> y http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?C.acetobutilicum). En segundo lugar, la región thrA*1-cysE se amplificó por PCR a partir del plásmido pME101-thrA*1-cysE usando los oligonucleótidos PlambdaR-thrA-F-3 (SEQ ID N°07) y cysE-R-4 (SEQ ID N°08) (secuencia de referencia en el cbersitio <http://ecogene.org/>). Ambos oligonucleótidos PlambdaR-thrA-R-2 (SEQ ID N°06) y PlambdaR-thrA-F-3 (SEQ ID N°07) estaban diseñados para poseer una secuencia solapada de 32 pb de longitud. Debido a esta secuencia solapada, en una tercera etapa, la región TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE se amplificaba por PCR al mezclar los productos de PCR TTadc-CI857-PlambdaR*(-35) y thrA*1-cysE y al usar los oligonucleótidos Apal-TTadc-CI857-F-1 (SEQ ID N°05) y cysE-R-4 (SEQ ID N°08). A continuación, este producto de PCR se clonó en el pSCB (Stratagene) y el vector resultante se verificó mediante secuenciación y se denominó pSCB-TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE.

Apal-TTadc-CI857-F-1 (SEQ ID N°05)

- 35 accttgccgaGGGCCCTAAAAATAAGAGTTACCTTAAATGGTAACTCTTATTTTTTTT
ATCAGCCAAACGTCTCTTCAGGCC

con

- una región (minúsculas) con bases adicionales,
- una región (mayúsculas subrayado) que aloja el sitio *Apal*,
- una región (mayúsculas) para la secuencia del terminador de la transcripción TTadc (terminador de la transcripción del gen *adc* procedente de *Clostridium acetobutilicum*, homólogo de 179847 a 179807 del megaplásmido pSLO1),
- una región (mayúsculas negrita) homóloga al extremo 3' del gen *ci857* procedente del bacteriófago lambda.

PlambdaR-thrA-R-2 (SEQ ID N°06)

CAACACTCTCATATGACCTCCTTAGTACATGCAACCATTATCACCGCCAGAGG
TAAATGTGCAACACGCACGGTGTAGATATTTATCCCTTGC

- 45 con

- una región (mayúsculas negrita) homóloga al extremo 5' del gen *thrA* (de 337 a 348, excepto para 1 base (mayúsculas negrita cursiva))
- una región (mayúsculas) homóloga al promotor P_R del bacteriófago lambda, excepto 1 base (mayúsculas cursiva) para obtener la versión *(-35) del P_R, forma variante en la que la caja -35 está modificada para obtener el consenso -35 (de TTGACT a TTGACA)
- una región solapada con el oligonucleótido PlambdaR-thrA-F-3 (mayúsculas subrayado).

PlambdaR-thrA-F-3 (SEQ ID N°07)

GCATGTACTAAGGAGGTCATATGAGAGTGTGAAGTTCGGCGGTACATCAG
TGGCAAATGC

con

- una región (mayúsculas) homóloga al promotor P_R del bacteriófago lambda,
- una región (mayúsculas negrita) homóloga al extremo 5' del gen *thrA* (de 337 a 377, excepto para 1 base (mayúsculas negrita cursiva))
- una región solapada con el oligonucleótido PlambdaR-thrA-R-2 (mayúsculas subrayado)

cysE-R-4 (SEQ ID N°08)

AGCTTGCATGCCTGCAGGTCG (homóloga a la región aguas abajo *cysE* del plásmido pME101-*thrA**1-*cysE*)

Para transferir los genes *thrA**1 y *cysE* en un vector de bajo número de copias, el vector pSCB-TTadc-*CI857*-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-*cysE* se restringió mediante *Bsr*BI y *Bam*HI y el fragmento TTadc-*CI857*-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-*cysE* se clonó en los sitios *Sma*I / *Bam*HI del vector pCL1920, dando como resultado el vector pCL1920-TTadc-*CI857*-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-*cysE*.

Posteriormente, la región PgapA-*metA**11 se amplificó a partir de la cepa MG1655 *metA**11 mediante una PCR de solapamiento. En primer lugar, el promotor PgapA se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos *Sma*I-PgapA-F (SEQ ID N°09) y PgapA-*metA**11-R (SEQ ID N°10) (secuencia de referencia en el ciber sitio <http://ecogene.org/>). En segundo lugar, el gen *metA**11 se amplificó por PCR al usar los oligonucleótidos PgapA-*metA**11-F (SEQ ID N°11) y *Bam*HI-*metA**11-R (SEQ ID N°12) (secuencia de referencia en el ciber sitio <http://ecogene.org/>). Tanto PgapA-*metA**11-R (SEQ ID N°10) como PgapA-*metA**11-F (SEQ ID N°11) estaban diseñados para solaparse en toda su secuencia. Debido a esta particularidad, en una tercera etapa, la región PgapA-*metA**11 se amplificó por PCR al mezclar los productos de PCR *metA**11 y PgapA y al usar los oligonucleótidos *Sma*I-PgapA-F (SEQ ID N°09) y *Bam*HI-*metA**11-R (SEQ ID N°12). El producto de PCR se restringió mediante *Sma*I y *Bam*HI, a continuación el fragmento digerido se hizo romo a fin de clonarlo en el sitio *Bam*HI romo del vector pCL1920-TTadc-*CI857*-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-*cysE*. El vector resultante se verificó al secuenciar y se denominó pCL1920-TTadc-*CI857*-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-*cysE*-PgapA-*metA**11.

*Sma*I-PgapA-F (SEQ ID N°09)

acgtCCCCGGGCAAGCCCAAGGAAGAGTGAGGC

con

- una región (minúsculas) con bases adicionales,
- una región (mayúsculas subrayado) que aloja el sitio *Sma*I,
- una región (mayúsculas) homóloga de 1860639 a 1860661 de la secuencia del promotor PgapA de *Escherichia coli*).

PgapA-*metA**11-R (SEQ ID N°10)

**GGCGGGTAGCTCGTCCGGCACACGAATCGGCATATATTCCACCAGCTATTT
GTTAGTGAATAAAAGG**

con

- una región (mayúsculas negrita) homóloga de 4212335 a 4212303 del gen *metA*
- una región (mayúsculas) homóloga de 1860794 a 1860761 de la secuencia del promotor *PgapA*

5 **PgapA-metA*11-F (SEQ ID N°11)**

**CCTTTTATTCACTAACAAATAGCTGGTGGAAATATATGCCGATTCGTGTGCCG
GACGAGCTACCCGCC**

con

- una región (mayúsculas negrita) homóloga de 4212335 a 4212303 del gen *metA*
- una región (mayúsculas) homóloga de 1860794 a 1860761 de la secuencia del promotor *PgapA*

10 **BamHI-metA*11-R (SEQ ID N°12)**

acgtGGATCCGAATTCCGACTATCACAGAAGATTAATCCAGCGTTGG

con

- una región (minúsculas) con bases adicionales,
- una región (mayúsculas subrayado) que aloja el sitio *BamHI*,

15 **- una región (mayúsculas cursiva) que aloja el sitio *EcoRI*,**

- una región (mayúsculas negrita) homóloga de 4213248 a 4213218 de la secuencia del gen *metA*.

Finalmente, el vector pCL1920-TTadc-*Cl857*-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-cysE-*PgapA-metA**11 se introdujo mediante electroporación en la cepa MG1655 *metA**11 *P*trc-*metH* *P*trcF-cysPUWAM *P*trcF-cysJIH *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-*metF* *DmetJ* *DpykF* *DpykA* *DpurU* *DyncA* *P*trc07-*serB* (pCC1BAC-*serA-serC*) dando como resultado la cepa MG1655 *metA**11 *P*trc-*metH* *P*trcF-cysPUWAM *P*trcF-cysJIH *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-*metF* *DmetJ* *DpykF* *DpykA* *DpurU* *DyncA* *P*trc07-*serB* (pCC1BAC-*serA-serC*) (pCL1920-TTadc-*Cl857*-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-cysE-*PgapA-metA**11).

20

5. Evaluación de la producción de metionina dependiente de la temperatura

25 Cepa 1: MG1655 *metA**11 *P*trc-*metH* *P*trcF-cysPUWAM *P*trcF-cysJIH *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-*metF* *DmetJ* *DpykF* *DpykA* *DpurU* *DyncA* *P*trc07-*serB* (pCC1BAC-*serA-serC*) (pCL1920-TTadc-*Cl857*-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-cysE-*PgapA-metA**11)

Las cepas de producción se evaluaron en matraces Erlenmeyer pequeños. Un precultivo de 5,5 ml se hizo crecer a 30°C durante 21 horas en un medio mixto (10 % de medio LB (Sigma 25 %) con 2,5 g.l⁻¹ de glucosa y 90% de medio mínimo PC1). Se usó para inocular un cultivo de 50 ml hasta una OD₆₀₀ de 0,2 en medio PC1. Se añadió espectinomycin a una concentración de 50 mg.l⁻¹, cloranfenicol a 30 mg.l⁻¹. La temperatura del cultivo era bien 30°C o bien 37°C. Cuando el cultivo hubo alcanzado una OD₆₀₀ de 5 a 7, los aminoácidos extracelulares se cuantificaron mediante HPLC después de la derivación por OPA/Fmoc y otros metabolitos pertinentes se analizaron usando HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa) y GC-MS después de la siliación. Para cada condición, se realizaron tres repeticiones.

30

35 Tabla 1: Composición del medio mínimo (PC1)

Compuesto	Concentración (g.l ⁻¹)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080
H ₃ BO ₃	0,0010
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0004
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00
Ácido cítrico	6,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	10,50
Na ₂ HPO ₄	2,00
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8,00
NH ₄ Cl	0,13
NaOH 4M	Ajustado hasta pH 6,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,04
Tiamina	0,01
Glucosa	10,00
Tiosulfato amónico	5,60
Vitamina B12	0,01
MOPS	10,00
IPTG	0,0024

Tabla 2: Rendimiento de metionina (R_{met}) en % g de metionina /g de glucosa producido en cultivo discontinuo por la cepa 1 bajo diferentes condiciones de cultivo. Para la definición del rendimiento de metionina/glucosa, véase posteriormente. DE indica la desviación estándar para los rendimientos que se calculaba sobre la base de varias repeticiones (N = número de repeticiones)

Condición	R_{met}	DE	N
Cepa 1 -Precultivo 30°C + Cultivo 30°C	10,6	0,4	3
Cepa 1 -Precultivo 30°C + Cultivo 37°C	12,9	0,8	9
Cepa 1 -Precultivo 37°C + Cultivo 37°C	7,4	0,9	6

La concentración de metionina extracelular se cuantificó mediante HPLC después de la derivación con OPA/FMOC. La concentración de glucosa residual se analizó usando HPLC con detección refractométrica. El rendimiento de metionina se expresó como sigue:

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

Como se muestra en la tabla 2 la termoinducción de la expresión de los genes *thrA* y *cysE* durante el procedimiento de cultivo incrementa la cantidad de metionina producida. La expresión constitutiva a lo largo del procedimiento de cultivo da como resultado un rendimiento de metionina bajo.

La Tabla 3 muestra que durante la inducción, las actividades de HDH y SAT se incrementan. La expresión constitutiva de *thrA* y *cysE* da como resultado niveles de actividad de HDH y SAT que están entre las condiciones no inducidas e inducidas, explicando en parte el rendimiento de metionina inferior. Otros factores celulares afectan lo más probablemente a estas actividades durante la expresión constitutiva y disminuyen las actividades. En conclusión, estos resultados demuestran que la inducción de *thrA* y *cysE* es ciertamente beneficiosa para incrementar el rendimiento de metionina.

Tabla 3: Las actividades de homoserina deshidrogenasa (HDH) y serina acetiltransferasa (SAT) se determinaron en los cultivos descritos anteriormente y se dan en mUI/mg DW. Las desviaciones estándar se calcularon sobre la base de varios cultivos independientes (N = número de repeticiones).

condición	HDH	SAT	N
Cepa 1 - Precultivo 30°C + Cultivo 30°C	33 ± 0	40 ± 12	3
Cepa 1 - Precultivo 30°C + Cultivo 37°C	94 ± 15	246 ± 12	3
Cepa 1 - Precultivo 37°C + Cultivo 37°C	51 ± 1	148 ± 28	3

Para la determinación de actividades enzimáticas in vitro, se cultivaron cepas de *E. coli* en medio mínimo según se describe anteriormente.

La determinación de la actividad de SAT se ha descrito en el documento WO 2007077041.

Para la determinación de la actividad de HDH in vitro, células de *E. coli* se resuspendieron en tampón de fosfato potásico 20 mM (pH 7,2) frío y se trataron por ultrasonidos sobre hielo (sonificador Branson, 70 W). Después de la centrifugación, se cuantificó la proteína contenida en los sobrenadantes (Bradford, 1976). Se ensayaron 10 µl de extracto (1,5 µg/ml de proteína) en 100 mM de Tris-HCl pH 9, 150 mM de KCl, 1 mM de NADP⁺ y 25 mM de L-homoserina durante 10 minutos a 30°C. La reducción de NADP⁺ en presencia de L-homoserina es seguida espectrofotométricamente durante 30 minutos a 340 nm.

Ejemplo II: Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km* (pBeloBAC11-PT7-RBST7-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ)

Cepas productoras de metionina con acumulación reducida de N-acetilmetionina se han descrito en las solicitudes de patente WO 2007077041 y WO 2009043803 que se incorporan como referencia en esta solicitud.

1. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA* (pBeloBAC11-PT7-RBST7-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ)

El plásmido pBeloBAC11-PT7-RBST7-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ se deriva de los plásmidos pBeloBAC11 (New England BioLabs; Kim y cols., 1996, Genomics, 34, 231-218) y pCL1920-TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 (descrito anteriormente).

En primer lugar, la región *thrA*1-SMC-cysE* (SMC para el sitio de clonación múltiple) se amplificó por PCR a partir del plásmido pCL1920-TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 al usar los siguientes oligonucleótidos, *SnaBI*-thrA-SMC-cysE-F (SEQ ID N°13) y *cysE*-R (SEQ ID N°14) (secuencia de referencia en el ciber sitio <http://ecogene.org/>).

SnaBI-thrA-SMC-cysE-F (SEQ ID N°13)

tgctacgtaccctctcatggaagtaggagtagtctga**GCTAGCTAGTCCGCTCGAG**ATACGAAAGAAG

TCCGCGAACTGG

con

- una región (minúsculas) homóloga al extremo 3' del gen *thrA* (de 2765 a 2799) y que aloja el sitio de restricción *SnaBI* (minúsculas cursiva)

- una región (negrita) para la región SMC que aloja los sitios de restricción *NheI* y *XhoI* (negrita cursiva)

- una región (mayúsculas) homóloga a la región aguas arriba 5' del gen *cysE* (de 3780796 a 3780819)

cysE-R (SEQ ID N°14)

CAACCAGTGACCGATGCG

homóloga al gen *cysE* de 3780226 a 3780243

5 El fragmento amplificado por PCR *thrA**1-SMC-*cysE* se restringió mediante *Sna*BI y *Stu*I y el fragmento digerido se clonó en los sitios *Sna*BI / *Stu*I del plásmido pCL1920-TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-*cysE*-PgapA-*metA**11. El plásmido resultante se verificó mediante secuenciación y se denominó pCL1920-TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-SMC-*cysE*-PgapA-*metA**11.

10 Posteriormente, la región PT7-RBST7-*thrA**1-SMC-*cysE*-PgapA-*metA**11-T7TΦ se amplificó por PCR a partir del plásmido pCL1920-TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-*cysE*-SMC-PgapA-*metA**11 al usar los siguientes oligonucleótidos, *Sfo*I-PT7-RBST7-NdeI-*thrA*-F (SEQ ID N°15) y *metA*-T7TΦ-*Sfo*I-R (SEQ ID N°16) (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=10461&window=7553&begin=21516>). Este producto de PCR se clonó en el vector pSCB (Stratagene). El vector resultante se verificó mediante secuenciación y se denominó pSCB-PT7-RBST7-*thrA**1-SMC-*cysE*-PgapA-*metA**11-T7TΦ. Para transferir la región PT7-RBST7-*thrA**1-SMC-*cysE*-PgapA-*metA**11-T7TΦ al vector de una sola copia pBeloBAC11, el pSCB-PT7-RBST7-*thrA**1-SMC-*cysE*-PgapA-*metA**11-T7TΦ se restringió mediante *Sfo*I y el fragmento PT7-RBST7-*thrA**1-SMC-*cysE*-PgapA-*metA**11-T7TΦ se clonó en el sitio *Not*I como del vector pBeloBAC11, dando como resultado el plásmido pBeloBAC11-PT7-RBST7-*thrA**1-SMC-*cysE*-PgapA-*metA**11-T7TΦ.

20 *Sfo*I-PT7-RBST7-NdeI-*thrA*-F (SEQ ID N°15)

GGCGCCtcgattcgaaactctgatagactcgaaattaatcgactcactatagggagaccacaacgggttcctctagaataaa
ttttgtttaacttaagaaggagatatatATGAGAGTGTTGAAGTTCGGCGG

con

- una región (mayúsculas cursivas) que aloja el sitio de restricción *Sfo*I
- una región (minúsculas) homóloga a la región promotora del gen *T7p45* (10A) del bacteriófago T7 (de 22858 a 22967)
- una región (mayúsculas negrita) homóloga al gen *thrA* (de 337 a 359, excepto para 1 base (mayúsculas negrita subrayado))

metA-T7TΦ-*Sfo*I-R (SEQ ID N°16)

GGCGCCctttcagcaaaaaaccctcaagaccggttagagggcccaaggggttatgctagtattgctcagcggtggcagca
gccaactcagcttccttccgggcttggtagTTAATCCAGCGTTGGATTCATGTGC

30 con

- una región (mayúsculas cursiva) que aloja el sitio de restricción *Sfo*I
- una región (minúsculas) homóloga a la región terminadora de la transcripción del gen *T7p45* (10A) del bacteriófago T7 (de 24111 a 24218)
- una región (mayúsculas negrita) homóloga al gen *metA* (de 4213208 a 4213232)

35 Finalmente, el plásmido pBeloBAC11-PT7-RBST7-*thrA**1-SMC-*cysE*-PgapA-*metA**11-T7TΦ se introdujo mediante electroporación en la cepa MG1655 *metA**11 *P*trc-*metH* *P*trcF-*cysPUWAM* *P*trcF-*cysJIH* *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-*metF* *D*metJ *D*pykF *D*pykA *D*purU *D*yncA dando como resultado la cepa MG1655 *metA**11 *P*trc-*metH* *P*trcF-*cysPUWAM* *P*trcF-*cysJIH* *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-*metF* *D*metJ *D*pykF *D*pykA *D*purU *D*yncA (pBeloBAC11-PT7-RBST7-*thrA**1-SMC-*cysE*-PgapA-*metA**11-T7TΦ).

2. Construcción de la cepa *MG1655 metA*11 DmaIS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km* (*pKD46*)

Para suprimir la región *maIS* y reemplazarla por la región *TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a kanamicina y ADN adicional, mientras se suprime la mayoría de la región relacionada. Con este propósito, se construyó el siguiente plásmido, *pUC18-DmaIS::TTadc-CI857* PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km*.

El plásmido *pUC18-DmaIS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km* se derivó de los plásmidos *pUC18* (Norrander y cols., 1983, Gene 26,101-106) y *pUC18-DmaIS::SMC::Km* (descrito anteriormente), *pAR1219* (Sigma) y *pCR4BluntTOPO-TTadc-CI857*-PlambdaR*(-35)-RBS01-SMC-TT07* (sintetizado por Geneart y descrito posteriormente).

2.1. Construcción del plásmido *pUC18-DmaIS::SMC::Km*

Para la construcción del plásmido *pUC18-DmaIS::SMC::Km*, se obtuvieron la región aguas arriba de *maIS* (*upmaIS*), el sitio de clonación múltiple (*SMC*) y el casete de kanamicina (*Km*) mediante PCR de solapamiento, y la región aguas abajo de *maIS* (*downmaIS*) se amplificó y se clonó posteriormente.

En primer lugar, la región *upmaIS* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *E. coli* *MG1655* usando los siguientes oligonucleótidos, *HindIII-upmaIS-F-1* (SEQ ID N°17) y *upmaIS-Km-R-2* (SEQ ID N°18) (secuencia de referencia del cbersitio <http://ecogene.org/>). En segundo lugar, la región *Km-SMC* se amplificó por PCR a partir del plásmido *pKD4* (Datsenko & Wanner, 2000) usando los oligonucleótidos *upmaIS-Km-F-3* (SEQ ID N°19) y *Km-SMC-R-4* (SEQ ID N°20). Ambos oligonucleótidos *upmaIS-Km-R-2* (SEQ ID N°18) y *upmaIS-Km-F-3* (SEQ ID N°19) estaban diseñados para poseer una secuencia solapada de 45 pb. Debido a esta secuencia solapada, en una tercera etapa, la región *upmaIS-Km-SMC* se amplificó por PCR al mezclar los productos de PCR *upmaIS* y *Km-SMC* y al usar los oligonucleótidos *HindIII-upmaIS-F-1* (SEQ ID N°17) y *Km-SMC-R-4* (SEQ ID N°20). A continuación, este producto de PCR se clonó en el *pSCB* (Stratagene) y el plásmido resultante se verificó mediante secuenciación y se denominó *pSCB-upmaIS-Km-SMC*.

HindIII-upmaIS-F-1 (SEQ ID N°17)

atcgtaAAGCTTTTCACTTTACCTGGCGCATTGG

con

- una región (minúsculas) con bases adicionales
- una región (mayúsculas cursiva) que aloja el sitio de restricción *HindIII*
- una región (mayúsculas) homóloga a la región aguas arriba del gen *maIS* (de 3734620 a 3734641)

upmaIS-Km-R-2 (SEQ ID N°18)

ctaaggaggatattcatatgACCGGTTTCGGCGGCGTTCTGGATGG

con

- una región (minúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko & Wanner, 2000, PNAS, 97, 6640-6645)
- una región (mayúsculas) homóloga a la región aguas arriba del gen *maIS* (de 3735836 a 3735860)

upmaIS-Km-F-3 (SEQ ID N°19)

CCATCCAGAACGCCGCCGAACCGGTcatatgaatatcctccttag

con

- una región (mayúsculas) homóloga a la región aguas arriba del gen *maIS* (de 3735836 a 3735860)
- una región (minúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko & Wanner, 2000, PNAS, 97, 6640-6645)

Km-SMC-R-4 (SEQ ID N°20)

GATCGATGGATCCATCTCGAGATCCGCGGATGTATACATGGGCCctgtaggctggagctg

5 cttcg

con

- una región (mayúsculas) con bases adicionales
- una región (mayúsculas cursiva) para el SMC que aloja sitios de restricción *Bam*HI, *Xho*I, *Sac*II, *Bst*Z17I, *Apa*I
- una región (minúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko & Wanner, 2000, PNAS, 97, 6640-6645).

A continuación, el plásmido pSCB-up*maIS*-Km-SMC se restringió mediante *Bam*HI e *Hind*III y el fragmento up*maIS*-Km-SMC se clonó en los sitios *Bam*HI / *Hind*III del vector pUC18, dando como resultado el vector pUC1B-up*maIS*-Km-SMC.

- 15 Posteriormente, la región down*maIS* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *E. coli* MG1655 usando los siguientes oligonucleótidos, down*maIS*-F-1 (SEQ ID N°21) y down*maIS*-R-2 (SEQ ID NO 22) (secuencia de referencia en el ciber sitio <http://ecogene.org/>). A continuación, este producto de PCR se clonó en el pSCB (Stratagene) y el plásmido resultante se verificó mediante secuenciación y se denominó pSCB-down*maIS*.

down*maIS*-F-1 (SEQ ID N°21)

20 ATGCTGAAATTCaccggtgaagcctggggccacggcg

con

- una región (mayúsculas) con bases adicionales
- una región (mayúsculas cursiva) que aloja el sitio de restricción *Eco*RI
- una región (minúsculas) homóloga a la región aguas abajo del gen *maIS* (de 3737020 a 3737044)

25 down*maIS*-R-2 (SEQ ID NO 22)

TACGATGAAATTCgggacgccataagcgttatcaatcacc

con

- una región (mayúsculas) con bases adicionales
- una región (mayúsculas cursiva) que aloja el sitio de restricción *Eco*RI
- una región (minúsculas) homóloga a la región aguas abajo del gen *maIS* (de 3738372 a 3738398).

A continuación, el plásmido pSCB-down*maIS* se restringió mediante *Eco*RI y el fragmento down*maIS* se clonó en el sitio *Eco*RI del vector pUC18, dando como resultado el vector pUC18-D*maIS*::SMC::Km.

2.2. Construcción del plásmido *pUC18-DmaIS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km*

Para la construcción del plásmido *pUC18-DmaIS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km*, la región *TTadc-CI857*-PlambdaR*(-35)-RBS01-SMC-TT07* (descrita posteriormente) presente en el *pCR4BluntTOPO-TTadc-CI857*-PlambdaR*(-35)-RBS01-SMC-TT07* (sintetizado por Geneart) se restringió mediante *Apal* y *BamHI* y el fragmento se subclonó en los sitios de restricción *Apal* y *BamHI* del plásmido *pUC18-DmaIS::SMC::Km*, dando el plásmido *pUC18-DmaIS::TTadc-CI857*-PlambdaR*(-35)-RBS01-SMC-TT07::Km*. A continuación, la región *PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07* se amplificó a partir del vector *pAR1219* (Sigma) usando los siguientes oligonucleótidos, *AvrII-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-F* (SEQ ID N°24) y *T7RNAPol-BstZ17I-TT07-BamHI-XhoI-R* (SEQ ID N°25) (secuencia de referencia en el cbersitio <http://ecogene.org/> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=10461&window=7553&begin=21516>). A continuación, el producto de PCR se restringió mediante *AvrII* y *BamHI* y el fragmento se clonó en el plásmido *pUC18-DmaIS::TTadc-CI857*-PlambdaR*(-35)-RBS01-SMC-TT07::Km* parcialmente restringido por *AvrII* y *BamHI*, dando el plásmido *pUC18-DmaIS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km* que se verificó mediante secuenciación de ADN.

Región *TTadc-CI857*-PlambdaR*(-35)-RBS01-SMC-TT07* presente en el *pCR4BluntTOPO-TTadc-CI857*-PlambdaR*(-35)-RBS01-SMC-TT07* (SEQ ID N°23) :

ggggccTAAAAATAAGAGTTACCTTAAATGGTAACCTCTTATTTTTTTTAttaattaaccta
ggTCAGCCAAACGTCTCTTCAGGCCACTGACTAGCGATAACTTTCCCCACAACG
GAACAACCTCTCATTGCATGGGATCATTGGGTACTGTGGGTTTAGTGTTGTAA

AACACCTGACCGCTATCCCTGATCAGTTTCTTGAAGGTAACTCATCACCCCCA
AGTCTGGCTATGCAGAAATCACCTGGCTCAACAGCCTGCTCAGGGTCAACGAG
AATTAACATTCCGTCAGGAAAGCTTGGCTTGGAGCCTGTTGGTGCGGTCATGG
AATTACCTTCAACCTCAAGCCAGAATGCAGAATCACTGGCTTTTTTGGTTGTGC
TTACCCATCTCTCCGCATCACCTTTGGTAAAGGTTCTAAGCTTAGGTGAGAACA
TCCCTGCCTGAACATGAGAAAAACAGGGTACTCATACTCACTTCTAAGTGAC
GGCTGCATGCTAACCCTTCATACATCTCGTAGATTTCTCTGGCGATTGAAGGG
CTAAATTCTTCAACGCTAACTTTGAGAATTTTGTAAAGCAATGCGGCGTTGTAA
GCATTTAATGCATTGATGCCATTAAATAAAGCACCAACGCCTGACTGCCCCAT
CCCCATCTTGTCTGCGACAGATTCTGGGATAAGCCAAGTTCATTTTTCTTTTTT
TCATAAATTGCCTTAAGGCGACGTGCGTCCTCAAGCTGCTCTTGTGTTAATGGT
TTCTTTTTTGTGCTCATcctaggAATCTATCACCGCAAGGGATAAATATCTAACA
CCGTGCGTGTTGACAATTTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGCATGTACT
AAGGAGGTTATAAGTATACtcacactggctcacttcgggtggcctttctgcggatcc

con

- regiones (minúsculas cursiva) que alojan los sitios de restricción *Apal*, *PacI*, *AvrII* y *BamHI*
- una región (mayúsculas subrayado) homóloga a la secuencia del terminador de la transcripción *TTadc* (terminador de la transcripción del gen *adc* de *Clostridium acetobutylicum*, homólogo de 179847 a 179807 del megaplásmido *pSLO1*) (*TTadc*)
- una región (mayúsculas) homóloga al gen *cI857* que aloja cambios de utilización de codones con el objeto de crear o suprimir algunos sitios de restricción (mayúsculas cursiva) (*CI857**)
- una región (mayúsculas negrita) homóloga al promotor P_R del bacteriófago *lambda*, excepto 1 base (mayúsculas negrita cursiva) para obtener la versión $P_{R,-35}$ del P_R , forma variante en la que la caja -35 se modifica para obtener el consenso -35 (de TTGACT a TTGACA) (*PlambdaR*(-35)*)
- una región (mayúsculas negrita subrayado) para el sitio de unión al ribosoma (*RBS01*)

- una región (mayúsculas cursiva subrayado) que aloja el sitio de restricción *Bst*Z171 (SMC)
- una región (minúsculas subrayado) para la secuencia del terminador de la transcripción T7Te (Harrington y cols., 2001, PNAS, 98(9), 5019-24) (TT07)

AvrII-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-F (SEQ ID N°24)

ctcatCCTAGGAATCTATCACCGCAAGGGATAAATATCTAACACCGTGCGTGT
TGA7CATT7TTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGCATGTACTAAGGAGGTTA
5 TAAatgaacacgattaacatcgctaagaacg

con

- una región (minúsculas) con bases adicionales
- una región (mayúsculas cursiva) que aloja el sitio de restricción *AvrII*
- 10 - una región (mayúsculas negrita) homóloga al promotor P_R del bacteriófago lambda, excepto 2 bases (mayúsculas negrita cursiva) para obtener la versión mutante PlambdaR03 del promotor P_R
- un sitio de unión al ribosoma (mayúsculas subrayadas)
- una región (minúsculas negrita) homóloga al extremo 5' del gen de ARN polimerasa del bacteriófago T7 (gen T7p07) (de 3171 a 3198)

T7RNAPol-BstZ171-TT07-BamHI-XhoI-R (SEQ ID N°25)

cggccagCTCGAGCGCGGATCCGCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAGTG
15 TGAGTATACttacggaacggaagtccgac

con

- una región (minúsculas) con bases adicionales
- una región (mayúsculas cursiva) que aloja los sitios de restricción *XhoI* y *BamHI*
- 20 - una región (mayúsculas negrita) para la secuencia del terminador de la transcripción T7Te (Harrington y cols., 2001, PNAS, 98(9), 5019-24)
- una región (mayúsculas cursiva subrayado) que aloja el sitio de restricción *Bst*Z171
- una región (minúsculas negrita) homóloga al extremo 3' del gen de ARN polimerasa del bacteriófago T7 (gen T7p07) (de 5801 a 5822).

2.3. Sustitución de la región *malS* por la región *TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07*

- 25 Finalmente, a fin de suprimir la región *malS* y reemplazarla por la región *TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07*, el plásmido pUC18-DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km se restringió mediante *Scal* y *EcoRV* y el fragmento DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km se introdujo mediante electroporación en la cepa MG1655 metA*11 (pKD46), en la que la enzima Red recombinasa permite la recombinación homóloga. A continuación, se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina, y la inserción del fragmento DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km se verificó mediante análisis por PCR con los oligonucleótidos malS-F (SEQ ID N°26), Km-R (SEQ ID N°27), T7RNAPol-F (SEQ ID N°28) y malS-R (SEQ ID N°29) (secuencia de referencia en el cbersitio <http://www.ecogene.org/> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=10461&window=7553&begin=1#protmap>; y Datsenko & Wanner, 2000, PNAS, 97, 6640-6645). La cepa se denomina MG1655 metA*11
- 30 DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNAPol-TT07::Km.
- 35

malS-F (SEQ ID N°26): GCACCAACAACGCTTCAGGC (homóloga a la región *malS* de 3734280 a 3734299)

Km-R (SEQ ID N°27): TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG (homóloga al casete de resistencia a kanamicina del vector pKD4)

5 T7RNApol-F (SEQ ID N°28): GCTGCTAAGCTGCTGGCTGC (homóloga al gen de ARN polimerasa del bacteriófago T7 gene (gen *T7p07*) de 5274 a 5293)

malS-R (SEQ ID NO 29): GGAAAGACTCATGCACAGC (homóloga a la región *malS* de 3738453 a 3738471).

3. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNApol-TT07::Km* (pBeloBAC11-PT7-RBST7-*thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ*)

10 Para suprimir la región *malS* y reemplazarla por la región TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNApol-TT07 en la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA* (pBeloBAC11-PT7-RBST7-*thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ*), la construcción

15 *DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNApol-TT07::Km* se transfirió mediante la transducción del fago P1 (véase posteriormente) desde la cepa MG1655 *metA*11 DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNApol-TT07::Km* hasta la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA* (pBeloBAC11-PT7-RBST7-*thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ*). Se seleccionaron transformantes resistentes a kanamicina y cloranfenicol y la inserción de la región

20 *DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNApol-TT07::Km* se verificó mediante un análisis por PCR con los oligonucleótidos malS-F (SEQ ID N°26), Km-R (SEQ ID N°27), T7RNApol-F (SEQ ID N°28) y malS-R (SEQ ID N°29) descritos previamente. La cepa retenida se denomina MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNApol-TT07::Km* (pBeloBAC11-PT7-RBST7-*thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ*).

Preparación del lisado del fago P1:

- 25
- Inoculación con 100 µl de un cultivo nocturno de la cepa MG1655 *metA*11 DmalS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNApol-TT07::Km* de 10 ml de LB complementado con kanamicina (50 µg/ml), glucosa (0,2%) y CaCl₂ (5 mM)
 - Incubación durante 1 h a 30°C con agitación
 - Adición de 100 µl de lisado de fago P1 preparado en la cepa MG1655 (aproximadamente 1,10⁹ fagos/ml)
 - Agitación a 30°C durante 3 horas hasta que todas las células sufrían lisis
- 30
- Adición de 200 µl de cloroformo y turbulencia
 - Centrifugación durante 10 min a 4500 g para eliminar el residuo celular
 - Transferencia del sobrenadante a un tubo estéril y adición de 200 µl de cloroformo
 - Almacenamiento del lisado a 4°C

Transducción:

- 35
- Centrifugación durante 10 min a 1500 g para 5 ml de un cultivo nocturno de la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU DyncA* (pBeloBAC11-PT7-RBST7-*thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ*) en medio LB
 - Suspensión de la pella celular en 2,5 ml de 10 mM de MgSO₄, 5 mM de CaCl₂
 - Tubos de control: 100 µl de células

100 µl de fagos P1 de la cepa MG1655 *metA**11 *DmaIS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNA_{pol}-TT07::Km*

- Tubos de ensayo: 100 µl de células + 100 µl de fagos P1 de la cepa MG1655 *metA**11 *DmaIS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNA_{pol}-TT07::Km*
- 5 - Incubación durante 30 min a 30°C sin agitación
- Adición de 100 µl de 1 M de citrato sódico en cada tubo y turbulencia
- Adición de 1 ml de LB
- Incubación durante 1 hora a 30°C con agitación
- 10 - Extensión sobre placas LB complementado con kanamicina (50 µg/ml) después de la centrifugación de los tubos durante 3 min a 7000 rpm
- Incubación a 30°C durante la noche

4. Evaluación de la producción de metionina dependiente de la temperatura

15 Cepa 2: MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}F-cysPUWAM* *P_{trc}F-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP* *P_{trc}36-ARNmst17-metF* *DmetJ* *DpykF* *DpykA* *DpurU* *DyncA* *DmaIS::TTadc-CI857*-PlambdaR03-RBS01-T7RNA_{pol}-TT07::Km* (pBeloBAC11-PT7-RBST7-*thrA**1-SMC-*cysE*-PgapA-*metA**11-T7TΦ

Las condiciones de precultivo y cultivo se describen anteriormente en el ejemplo 1. Se usó kanamicina en lugar de espectinomomicina. La temperatura de cultivo era bien 30°C o bien 34°C.

20 Tabla 4: Rendimiento de metionina (R_{met}) en % g de metionina /g de glucosa producido en cultivo discontinuo por la cepa 2 a 30 y 34°C. Para la definición precisa del rendimiento de metionina/glucosa, véase anteriormente. DE indica la desviación estándar para los rendimientos que se calculaba sobre la base de tres repeticiones.

Condición	R_{met}	DE	N
Cepa 2 - Precultivo 30°C + Cultivo 30°C	6,7	0,1	3
Cepa 2 - Precultivo 30°C + Cultivo 34°C	9,9	0,4	3

25 La inducción de *thrA* y *cysE* incrementa la cantidad de metionina producida. Esto se confirma por un análisis de las dos actividades HDH y SAT. Ambas actividades se incrementan con el cambio hasta 34 °C.

30 Tabla 5: Las actividades de homoserina deshidrogenasa (HDH, *thrA**1) y serina acetiltransferasa (SAT, *cysE*) se determinaron en los cultivos descritos anteriormente y se dieron en mUI/mg de proteínas. Las desviaciones estándar se calcularon sobre la base de varios cultivos independientes (N = número de repeticiones).

condición	HDH	SAT	N
Cepa 2 - Precultivo 30°C + Cultivo 30°C	58,9 ± 2,8	77,0 ± 8,3	3
Cepa 2 - Precultivo 30°C + Cultivo 34°C	91,7 ± 4,4	131,0 ± 9,7	3

Ejemplo III: Construcciones de las cepas termoinducibles probadas en los ejemplos IV y V posteriores

1. Protocolos

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

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

10 Se llevó a cabo sustitución alélica o la alteración génica en locus cromosómicos especificados mediante recombinación homóloga según se describe por Datsenko. & Wanner (2000). La resistencia a cloranfenicol (Cm) *cat*, la resistencia a kanamicina (Km) *kan*, los genes de resistencia a gentamicina (Gt) *gm* o la resistencia a tetraciclina (Tc) *tet*, flanqueados por sitios de reconocimiento de F₁p, se amplificaron mediante PCR al usar los plásmidos pKD3 o pKD4, p34S-Gm (Dennis et Ziltra, AEM julio 1998, p 2710-2715) o pLOI2065 (Underwood y cols., Appl Environ Microbiol. diciembre 2002; 68(12): 6263-6272) como plantilla, respectivamente. Los productos de PCR resultantes se usaron para transformar la cepa de *E. coli* receptora que aloja el plásmido pKD46 que expresa la λ Red (γ , β , ϵ , ϕ) recombinasa. A continuación, se seleccionaron transformantes resistentes a antibióticos y la estructura cromosómica de los locus mutados se verificó mediante análisis por PCR con los cebadores apropiados listados en la Tabla 2.

15 Los genes de resistencia *cat*, *kan*, *gm* y *tc* se retiraron al usar el plásmido pCP20 según se describe por Datsenko. & Wanner (2000), excepto que los clones que alojaban el plásmido pCP20 se cultivaron a 37°C sobre LB y a continuación se probaron con respecto a la pérdida de resistencia a antibióticos a 30°C. A continuación, los clones sensibles a antibióticos se verificaron mediante PCR usando los cebadores listados en la Tabla 2.

Protocolo 2: Transducción del fago P1

25 Se transfirieron modificaciones cromosómicas a una cepa receptora de *E. coli* dada mediante transducción de P1. El protocolo está compuesto por 2 etapas: (i) preparación del lisado fágico sobre 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

- Inocúlense 100 μ l de un cultivo nocturno de la cepa MG1655 con la modificación cromosómica de interés en 10 ml de LB + Cm 30 μ g/ml o Km 50 μ g/ml o Gt 10 μ g/ml o Tet 10 μ g/ml + glucosa 0,2% + CaCl₂ 5 mM.
- Incúbense 30 min a 37°C con agitación.
- 30 - Añádanse 100 μ l de lisado de fago P1 preparado sobre la cepa donante MG1655 (aprox. 1×10^9 fagos/ml).
- Agítase a 37°C durante 3 horas hasta la lisis completa de las células.
- Añádanse 200 μ l de cloroformo, y sométase a turbulencia
- Centrifúguese 10 min a 4500 g para eliminar el residuo celular.
- Transfírase el sobrenadante a un tubo estéril.
- 35 - Almacénese el lisado a 4°C.

Transducción

- Centrifúguense 10 min a 1500 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 P1 de la cepa MG1655 con la modificación en el cromosoma (tubo de ensayo) y como tubos de control 100 µl de células sin fago P1 y 100 µl de fago P1 sin células.
- Incúbese 30 min a 30°C sin agitación.
- 5 - 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 7000 rpm.
- Siémbrese en placa sobre LB + Cm 30 µg/ml o Km 50 µg/ml o Gt 10 µg/ml o Tet 10 µg/ml
- 10 - Incúbese a 37°C durante la noche.

A continuación, se seleccionaron los transductantes resistentes a antibióticos y la estructura cromosómica del locus mutado se verificó mediante análisis por PCR con los cebadores apropiados listados en la Tabla 2.

15 **Tabla 6:** Lista de genotipos y números correspondientes de cepas intermedias y cepas productoras que aparecen en los siguientes ejemplos.

Cepa Número	Genotipo
3	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>P</i> <i>trc</i> - <i>metH</i> <i>P</i> <i>trc</i> F-cysPUWAM <i>P</i> <i>trc</i> F-cysJIH <i>P</i> <i>trc</i> 09-gcvTHP <i>P</i> <i>trc</i> 36-ARNmst17- <i>metF</i> <i>P</i> <i>trc</i> 07-serB Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::TTadC-CI857-PlambdaR*(35)- <i>thrA</i> *1-cysE Δ <i>pgaABCD</i> ::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ <i>uxaCA</i> ::TT07-TTadC-PlambdaR*(35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ CP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11
4	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>P</i> <i>trc</i> - <i>metH</i> <i>P</i> <i>trc</i> F-cysPUWAM <i>P</i> <i>trc</i> F-cysJIH <i>P</i> <i>trc</i> 09-gcvTHP <i>P</i> <i>trc</i> 36-ARNmst17- <i>metF</i> <i>P</i> <i>trc</i> 07-serB Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::TTadC-CI857-PlambdaR*(35)- <i>thrA</i> *1-cysE Δ <i>pgaABCD</i> ::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ <i>uxaCA</i> ::TT07-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ CP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ wcaM::TT02-TTadC-PlambdaR*(35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11::Cm
5	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>P</i> <i>trc</i> - <i>metH</i> <i>P</i> <i>trc</i> F-cysPUWAM <i>P</i> <i>trc</i> F-cysJIH <i>P</i> <i>trc</i> 09-gcvTHP <i>P</i> <i>trc</i> 36-ARNmst17- <i>metF</i> <i>P</i> <i>trc</i> 07-serB Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::TTadC-CI857-PlambdaR*(35)- <i>thrA</i> *1-cysE Δ <i>pgaABCD</i> ::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ <i>uxaCA</i> ::TT07-TTadC-PlambdaR*(35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ CP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ wcaM::TT02-TTadC-PlambdaR*(35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11::Cm Δ yjbl::TT02-TTadC-PlambdaR*(35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11::Tc
6	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>P</i> <i>trc</i> - <i>metH</i> <i>P</i> <i>trc</i> F cysPUWAM <i>P</i> <i>trc</i> F cysJIH <i>P</i> <i>trc</i> 09-gcvTHP <i>P</i> <i>trc</i> 36-ARNmst17- <i>metF</i> <i>P</i> <i>trc</i> 07-serB Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>pykA</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncK</i> Δ <i>malS</i> ::TTadC-CI857-PlambdaR*(35)- <i>thrA</i> *1-cysE Δ <i>pgaABCD</i> ::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ <i>uxaCA</i> ::TT07-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ CP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11 Δ wcaM::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11::Cm Δ yjbl::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11::Tc Δ melB::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01- <i>thrA</i> *1-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11::Gt
7	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>P</i> <i>trc</i> - <i>metH</i> <i>P</i> <i>trc</i> F-cysPUWAM <i>P</i> <i>trc</i> F-cysJIH <i>P</i> <i>trc</i> 09-gcvTHP <i>P</i> <i>trc</i> 36-ARNmst17- <i>metF</i> Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::TTadC-CI857-PlambdaR*(-35)- <i>thrA</i> *1-cysE
8	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>P</i> <i>trc</i> - <i>metH</i> <i>P</i> <i>trc</i> F-cysPUWAM <i>P</i> <i>trc</i> P-cysJIH <i>P</i> <i>trc</i> 09-gcvTHP <i>P</i> <i>trc</i> 36-ARNmst17- <i>metF</i> Δ <i>metJ</i> Δ <i>pykF</i> Δ <i>purU</i> Δ <i>yncA</i> Δ <i>malS</i> ::TTadC-CI857-PlambdaR*(-35)- <i>thrA</i> *1-cysE pBeloBAC11-PL1*1/RBS01*2- <i>thrA</i> *1-SMC-cysE-PgapA- <i>metA</i> *11-T7T Φ

1. Construcción de la cepa 3: *MG1655 metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857 PlambdaR*(35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11*

La cepa productora de metionina 3 (Tabla 6) se ha descrito en las solicitudes de patente EP10306164.4 y US61/406249. Estas solicitudes se incorporan como referencia en esta solicitud.

2. Construcción de la cepa 4: *MG1655 metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm*

La modificación cromosómica *ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* descrita en las solicitudes de patente EP10306164.4 y US61/406249 se transdujo en la cepa 3 (Tabla 6) con un lisado de fago P1 procedente de la cepa *MG1655 metA*11 pK46 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* descrita en las solicitudes de patente EP10306164.4 y US61/406249, según el Protocolo 2.

Se seleccionaron transductantes resistentes a cloranfenicol y la presencia de la modificación cromosómica *ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* se verificó mediante PCR con Ome1707-DwcaM_verif_F (SEQ ID N°30) y Ome1708-DwcaM_verif_R (SEQ ID N°31) (Tabla 7). La cepa *MG1655 metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* resultante se denominó cepa 4 (Tabla 1).

3. Construcción de la cepa 5: *MG1655 metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm ΔyjbI::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc*

3.1. Construcción del plásmido *pUC18-TTadc-CI*0-PlambdaR*(35)-ΔyjbI::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc*

El plásmido *pUC18-TTadc-CI*0-PlambdaR*(35)-ΔyjbI::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* se deriva de los plásmidos *pUC18-TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* y *pUC18-TTadc-CI*0-PlambdaR*(35)-ΔyjbI::TT02-SMC* descritos anteriormente, *pMA-RQ-TTadc-CI*0-PlambdaR*(35)-RBS01*2* descrito posteriormente y *pLOI2065* (Underwood y cols., Appl Environ Microbiol. diciembre 2002; 68(12): 6263-6272).

3.1.1. Construcción de *pUC18-TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc*

El plásmido *pUC18-TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* se deriva de *pMA-RQ-TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-RBS01*2* descrito anteriormente, *pLOI2065* (Underwood y cols., Appl Environ Microbiol. diciembre 2002; 68(12): 6263-6272) y *pUC18-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* descrito en las solicitudes de patente EP10306164.4 y US61/406249.

Construcción del plásmido *pMA-RQ-TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-RBS01*2*

*pMA-RQ-TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-RBS01*2* se deriva de los plásmidos *pMA-RQ-TTadc-CI*1-PlambdaR*(-35)-RBS01*2* y *pMA-RQ-TTadc-CI*3-PlambdaR*(-35)-RBS01*2* que han sido sintetizados por GeneArt (<http://www.geneart.com/>). Los fragmentos *TTadc-CI*1-PlambdaR*(-35)-RBS01*2* y *TTadc-CI*3-PlambdaR*(-35)-RBS01*2* se clonaron en los sitios *SfiI* del plásmido *pMA-RQ* de GeneArt y contienen las siguientes secuencias, respectivamente:

pMA-RQ-*TTadc-cl*1-PlambdaR*(-35)-RBS01*2* (SEQ ID N°32)

ggccgtcaaggccgcatggcgcccttataacctcctta*GTACATGCAACCATTTACCCGCCAGAGGT*
AAAATTGTCAACACGCACGGTGTTAGATATTTATCCCTTGCGGTGATAGATTTAACGT
 ATGAGCACAAAAAAGAAACCATTAACACAAGAGCAGCTTGAGGACGCACGTC
 GCCTTAAGGCAATTCATGAAAAAAGAAAAATGAACTTGGCTTATCCCAGGAA
 TCTGTCGCAGACAAGATGGGGATGGGGCAGTCAGGCGTTGGTGCTTTATTTAA
 TGGCATCAATGCATTAAATGCTTACAACGCCGCATTGCTTGCGAAAATTCTCAA
 AGTTAGCGTTGAAGAATTTAGCCCTTCAATCGCCAGAGAAATCTACGAGATGT
 ATGAAGCGGTTAGCATGCAGCCGTCACCTAGAAGTGAGTATGAGTACCCTGTT
 TTTTCTCATGTTTCAGGCAGGGATGTTCTCACCTGAACTTAGAACCTTTACCAA
 GGTGATGCGGAGAGATGGGTAAGCACAAACCAAAAAAGCCAGTGATTCTGCAT
 TCTGGCTTGAGGTTGAAGGTAATTCCATGACCGCACCAACAGGCTCCAAGCCA
 AGCTTTTCTGACGGAATGTTAATTCTCGTTGACCCTGAGCAGGCTGTTGAGCCA
 GGTGATTTCTGCATAGCCAGACTTGGGGGTGATGAGTTTACCTTCAAGAACT
 GATCAGGGATAGCGGTTCAGGTGTTTTTACAACCACTAAACCCACAGTACCCAA
 TGATCCCATGCAATGAGAGTTGTTCCGTTGTGGGGAAAGTTATCGCTAGTCAGT
 GGCCTGAAGAGACGTTTGGCTGATAAAAAAATAAGAGTTACCATTTAAGGT
 AACTCTTATTTTTAGGGCCCTTAATTAACCTGGGCCTCATGGGCC

- minúsculas subrayadas correspondientes a los sitios de restricción *Sfi* y *Asc*
- 5 - minúsculas negrita correspondientes a las secuencias de RBS01*2 (TAAGGAGGTTATAA) en orientación inversa y el sitio de restricción *Psi*,
 - mayúsculas cursiva homólogas al promotor P_R del bacteriófago lambda (*PlambdaR*(-35)*, (Mermet-Bouvier & Chauvat, 1994, Current Microbiology, vol. 28, pp 145-148)).
- 10 - mayúsculas correspondientes a la secuencia de la proteína represora *cl* del bacteriófago lambda donde el nucleótido T67 se cambiaba por C67 generando un cambio de aminoácido Tyr23His (Mermet-Bouvier & Chauvat, 1994, Current Microbiology, vol. 28, pp 145-148). Esta secuencia se denominó *cl*1*.
 - mayúsculas negrita homólogas a la secuencia del terminador de la transcripción *TTadc* en orientación inversa (terminador de la transcripción del gen *adc* procedente de *Clostridium acetobutylicum*, homóloga de 179847 a 179807 del megaplásmido pSLO1).
- 15 - mayúsculas subrayadas correspondientes a *Apal*, *Pacl* y *Sfi*

pMA-RQ-TTadc-Cl*3-PlambdaR*(35)-RBS01*2 (SEQ ID N°33)

ggccgtcaaggccgcatggcgcccttataa**acctcctta**GTACATGCAACCATTATCACCGCCAGAGGT
AAAATTGTCAACACGCACGGTGTTAGATATTTATCCCTTGCGGTGATAGATTTAACGT
ATGAGCACAAAAAAGAAACCATTAACACAAGAGCAGCTTGAGGACGCACGTC
GCCTTAAGGCAATTTATGAAAAAAGAAAAATGAACTTGGCTTATCCCAGGAA
TCTGTCGCAGACAAGATGGGGATGGGGCAGTCAGGCGTTGGTGCTTTATTTAA
TGGCATCAATGCATTAAATGCTTACAACGCCGCATTGGCGACAAAAATTCTCA
AAGTTAGCGTTGAAGAATTTAGCCCTTCAATCGCCAGAGAAATCTACGAGATG
TATGAAGCGGTTAGCATGCAGCCGTCCTTAGAAGTGAGTATGAGTACCCTGT
TTTTTCTCATGTTTACGGCAGGGATGTTCTCACCTAAGCTTAGAACCTTTACCAA
AGGTGATGCGGAGAGATGGGTAAGCACAAACCAAAAAAGCCAGTGATTCTGCA
TTCTGGCTTGAGGTTGAAGGTAATTCCATGACCGCACCAACAGGCTCCAAGCC
AAGCTTTTCTGACGGAATGTTAATTCTCGTTGACCCTGAGCAGGCTGTTGAGCC
AGGTGATTTCTGCATAGCCAGACTTGGGGGTGATGAGTTTACCTTCAAGAAAC
TGATCAGGGATAGCGGTCAGGTGTTTTTACAACCACTAAACCCACAGTACCCA
ATGATCCCATGCAATGAGAGTTGTTCCGTTGTGGGGAAAGTTATCGCTAGTCA
GTGGCCTGAAGAGACGTTTGGCTGATAAAAAAATAAGAGTTACCATTTAAG
GTAACTCTTATTTT**AGGGCCCTTAATTA**ACTGGGCCTCATGGGCC

- minúsculas subrayadas correspondientes a los sitios de restricción *Sfi* y *Asc*I
- minúsculas negrita correspondientes a secuencias de RBS01*2 (TAAGGAGGTTATAA) en orientación inversa y el sitio de restricción *Psi*I,
- mayúsculas cursiva homólogas al promotor *P_R* del bacteriófago lambda (*PlambdaR**(35), (Mermet-Bouvier & Chauvat, 1994, Current Microbiology, vol. 28, pp 145-148)).
- mayúsculas correspondientes a la secuencia de la proteína represora *cl* del bacteriófago lambda donde los nucleótidos 196-CTTGCG-201 se cambiaban por 196-GCGACA-201 generando dos cambios de aminoácido Leu66Ala y Ala67Thr (Mermet-Bouvier & Chauvat, 1994, Current Microbiology, vol. 28, pp 145-148). Esta secuencia se denominó *cl**3.
- mayúsculas negrita homólogas a la secuencia terminadora de la transcripción TTadc en orientación inversa (terminador de la transcripción del gen *adc* procedente de *Clostridium acetobutylicum*, homólogo de 179847 a 179807 del megaplásmido pSLO1).
- mayúsculas subrayadas correspondientes a *Ap*al, *Pa*cl y *Sfi*I

Para construir pMA-RQ-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(35)-RBS01*2, el fragmento de *Xmn*I/*Nsi*I *Nsi*I-Cl*3-PlambdaR*(35)-RBS01*2-*Xmn*I purificado de pMA-RQ-TTadc-Cl*3-PlambdaR*(35)-RBS01*2 descrito anteriormente se clonó entre los sitios *Xmn*I y *Nsi*I del plásmido pMA-RQ-TTadc-Cl*1-PlambdaR*(35)-RBS01*2 descrito anteriormente creando el alelo silvestre del represor proteínico *cl*. El plásmido resultante se verificó mediante secuenciación de ADN y se denominó pMA-RQ-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(35)-RBS01*2.

Construcción del plásmido pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(35)-Δ*pgaABCD*::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm

El plásmido pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-Δ*pgaABCD*::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm se deriva de pUC18-Δ*pgaABCD*::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm descrito en las solicitudes de patente EP10306164.4 y US61/406249 y pMA-RQ-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-RBS01*2 descrito anteriormente.

Para construir pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm*, el fragmento de *Apall/Psil TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)*, tratado mediante fragmento (de Klenow) grande de ADN polimerasa I de *E. coli*, y purificado de pMA-RQ-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(35)-RBS01*2*, se clonó entre los sitios *SfoI* del plásmido pUC18-*ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlanlbdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm*. El plásmido resultante se verificó mediante restricción y se denominó pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm*.

Finalmente, para construir pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-ApgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*0-cysE-PgapA-metA*11::Tc*, el casete de resistencia FRT-Tc-FRT se amplificó mediante PCR con los cebadores Ome 1836-HindIII-K7-FRT-Tc-F (SEQ ID N°34) y Ome 1837-SmaI-BstZ17I-K7-FRT-Tc-R (SEQ ID N°35) usando pLOI2065 como plantilla.

Ome1836-HindIII-K7-FRT-Tc-F (SEQ ID N°34)

**GCCCAAGCTTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAG
AATAGGAAGTTCGGAATAGGAACCGGATCAATTCATCGCGCGTC**

con

- mayúsculas subrayadas correspondientes a los sitios de restricción *HindIII* y bases adicionales,
- secuencia en mayúsculas y negrita correspondiente a la secuencia FRT del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),
- secuencia en mayúsculas homóloga a la secuencia del gen de resistencia a tetraciclina situado sobre pLOI2065 (Underwood y cols., Appl Environ Microbiol. diciembre 2002; 68(12): 6263-6272).

Ome1837-SmaI-BstZ17I-K7-FRT-Tc-R (SEQ ID N°35)

**TCCCCCGGGGTATACCATATGAATATCCTCCTTAGTTTCCTATTCCGAAGTTC
CTATTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTCGAATTGTCGACAAGCTAGCTTGC**

con

- mayúsculas subrayadas correspondientes a los sitios de restricción *SmaI* y *BstZ17I* y bases adicionales,
- secuencia en mayúsculas y negrita correspondiente a la secuencia FRT del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),
- secuencia en mayúsculas homóloga a la secuencia del gen de resistencia a tetraciclina situado sobre pLOI2065 (Underwood y cols., Appl Environ Microbiol. diciembre 2002; 68(12): 6263-6272).

El producto de PCR FRT-Tc-FRT se digirió mediante *BstZ17I* e *HindIII* y se trató mediante el fragmento (de Klenow) grande de ADN polimerasa I de *E. coli*. A continuación, el fragmento resultante se clonó entre los *BstZ17I* y *PacI* que se ha tratado mediante fragmento (de Klenow) grande de ADN polimerasa I de *E. coli*. El plásmido seleccionado tiene el casete de resistencia a *tc* en la misma orientación que el casete de resistencia a *amp* del plásmido pUC18 y se verificó mediante secuenciación de ADN y se denominó pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01*2-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11:: Tc*.

3.1.2. Construcción del plásmido pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(35)-ΔyjbI::TT02-SMC*

Para construir el fragmento *ΔyjbI::TT02-MCS*, se realizó PCR de solapamiento entre la región aguas arriba de *yjbI* (*upyjbI*), el terminador de la transcripción *TT02*, el sitio de clonación múltiple (MCS) y la región aguas abajo de *yjbI* (*downyjbI*).

En primer lugar, el fragmento *upyjbI-TT02-MCS* se amplificó a partir de ADN genómico de *E. coli* MG1655 usando los cebadores Ome 1852- *SfoI*-KpnI-DyjbI amont-F (SEQ ID N°36) y Ome 1853- SMC-TT02- DyjbI amont-R (SEQ ID N°37) mediante PCR. A continuación, el fragmento *TT02-MCS-downyjbI* se amplificó a partir de ADN genómico de *E. coli* MG1655 usando los cebadores Ome 1854-TT02-SMC-DyjbI aval-F (SEQ ID N°38) y Ome 1855- *SfoI*-KpnI-

Dyjb1 aval-R (SEQ ID N°39) mediante PCR. Los cebadores Ome 1853- SMC-TT02- Dyjb1 amont-R (SEQ ID N°37) y Ome 1854-TT02-SMC- Dyjb1 aval-F (SEQ ID N°38) se han diseñado para solaparse a través de una región de 36 nucleótidos de longitud. Finalmente, el fragmento upyjb1-TT02-MCS-downyjb1 se amplificó al mezclar los amplicones upyjb1-TT02-MCS y TT02-MCS-downyjb1 y usar los cebadores Ome 1852- Sfol-Kpn1-Dyjb1 amont-F (SEQ ID N°36) y Ome 1855- Sfol-Kpn1-Dyjb1 aval-R (SEQ ID N°39). El producto de PCR de fusión resultante se digirió mediante Sfol y se clonó entre los sitios *EcoRI* del plásmido pUC18-*TTadc-Cl*0-PlambdaR*(35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm*, descrito anteriormente, que se ha tratado mediante fragmento (de Klenow) grande de ADN polimerasa I de *E. coli*. El plásmido resultante se verificó mediante Secuenciación de ADN y se denominó pUC18-*TTadc-Cl*0-PlambdaR*(35)-Δyjb1::TT02-MCS*.

10 Ome 1852-Sfol-Kpn1-Dyjb1 amont-F (SEQ ID N°36)

CGTAGGCGCCGGTACCGAGTGCAGATCGGCTGGAAGGCG

con

- mayúsculas subrayadas correspondientes a los sitios de restricción *Sfol* y *Kpn1* y bases adicionales,
- secuencia en mayúsculas homóloga a la secuencia aguas arriba del gen *yjb1* (4247987-4248009, secuencia de referencia en el cbersitio <http://ecogene.org/>

Ome 1853-SMC-TT02- Dyjb1 amont-R (SEQ ID N°37)

GCTTGTATACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTTCGACTGAGCCTTTTCG
TTTTATTTGATGCATTTCTGTAGAATTTTACACTTATAGTATCATTACTGATT
GAGACTTCA

con

- secuencia en mayúsculas subrayadas para el sitio de restricción *BstZ171* y el principio de un sitio de clonación múltiple,
- secuencia en mayúsculas correspondiente al terminador de la transcripción T₁ de *rrnB* de *E. coli* (Orosz A, Boros I y Venetianer P. Eur. J. Biochem. 1991 Nov 1;201(3):653-9)
- secuencia en mayúsculas y negrita homóloga a la secuencia aguas abajo del gen *yjb1* (4248931-4248980, secuencia de referencia en el cbersitio <http://ecogene.org/>).

25 Ome 1854-TT02-SMC- Dyjb1 aval-F (SEQ ID N°38)

AGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTATACAAGCTTTACCTAGGGCCCTTA
ATTAATAATGAATAAGGGTGTTTAAGTAAAGGAAAACATCACCGTTCCTGGC
AT

con

- secuencia en mayúsculas correspondiente al terminador de la transcripción T₁ de *rrnB* de *E. coli* (Orosz A, Boros I y Venetianer P. Eur. J. Biochem. 1991 Nov 1;201(3):653-9)
- secuencia en mayúsculas y negrita que contiene un sitio de clonación múltiple: *BstZ171*, *HindIII*, *AvrII*, *Apal*, *PacI*,
- secuencia en mayúsculas subrayadas homóloga a la secuencia aguas abajo del gen *yjb1* (4250286-4250335, secuencia de referencia en el cbersitio <http://ecogene.org/>).

Ome 1855-Sfol-KpnI- Dyjbl aval-R (SEQ ID N°39)

CGTAGGCGCCGGTACCCAGCATAATCATTACCACACATCCG

con

- mayúsculas subrayadas correspondientes a los sitios de restricción Sfol y KpnI y bases adicionales,

- 5 - secuencia en mayúsculas homóloga a la secuencia aguas arriba del gen *yjbl* (4251224-4251249, secuencia de referencia en el cbersitio <http://ecogene.org/>)

3.1.3. Construcción del plásmido pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(35)-Dyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc*

- 10 Para construir pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(35)-Dyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc*, el fragmento de *BstZ17I/SmaI PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* purificado de pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc*, se clonó entre los sitios *PacI/BstZ17I* del plásmido pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-Δyjbl::TT02-SMC* que se había tratado mediante fragmento (de Klenow) grande de ADN polimerasa I de *E. coli*. El plásmido seleccionado tiene el casete de resistencia a *tc* en la misma orientación que el casete de resistencia a *amp* del
- 15 plásmido pUC18 y se verificó mediante secuenciación de ADN y se denominó pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-Dyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc*

3.2. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 Dyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc pKD46*

- 20 Para reemplazar el gen *yjbl* por la región *TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc*, pUC18-*TTadc-CI*0-PlambdaR*(-35)-Dyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* se digirió mediante las enzimas de restricción *AhdI* y *KpnI* y el fragmento digerido restante *Δyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* se introdujo en la cepa MG1655 *metA*11 pKD46* según el Protocolo 1.

- 25 Se seleccionaron recombinantes resistentes a tetraciclina y la presencia de la modificación cromosómica *Δyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* se verificó mediante PCR con los cebadores Ome1856-Dyjbl-verif1-F (SEQ ID N°40), Ome1857-Dyjbl-verif2-R (SEQ ID N°41), Ome 1838-K7-FRT-Tc-seq-F (SEQ ID N°42) y Ome1815-*metA*11*-seq-F (SEQ ID N°43) (Tabla 7) y mediante secuenciación de ADN. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA*11 Δyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* (pKD46).

- 30 3.3. Transducción de *Δyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* en la cepa 4

- La modificación cromosómica *Δyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* se transdujo en la cepa 4 (Tabla 6), descrita anteriormente, con un lisado de fago P1 procedente de la cepa MG1655 *metA*11 pKD46 Δyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* descrita anteriormente, según el Protocolo 2. Se seleccionaron transductantes resistentes a tetraciclina y la presencia de la modificación cromosómica *Δyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* se verificó mediante PCR con Ome1856-Dyjbl-verif1-F (SEQ ID N°40), Ome1857-Dyjbl-verif2-R (SEQ ID N°41), Ome 1838-K7-FRT-Tc-seq-F (SEQ ID N°42), y Ome1815-*metA*11*-seq-F (SEQ ID N°43) (Tabla 2). La cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm Dyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc* resultante se denominó cepa 5 (Tabla 6).

- 45 4. Construcción de la cepa 6: MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm Dyjbl::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc ΔmelB::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Gt*
- 50

4.1. Construcción del plásmido *pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔmelB::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Gt*

El plásmido *pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔmelB::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Gt* se deriva de *pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Gt* y *pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔmelB::TT02-MCS::Gt* descritos posteriormente.

4.1.1. Construcción del plásmido *pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Gt*

El plásmido *pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Gt* se deriva de *pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔCP4-6::TT02-SMC::Gt* y *pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔpgaABCD::TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* descritos anteriormente.

Construcción de *pMA-ΔCP4-6::TT02-MCS::Gt*

Para construir el plásmido *pMA-ΔCP4-6::TT02-MCS::Gt*, el casete de resistencia FRT-Gt-FRT se amplificó mediante PCR con los cebadores *BstZ17I-FRT-Gt-F* (SEQ ID N°44) e *HindIII-FRT-Gt-R* (SEQ ID N°45) usando *p34S-Gm* como plantilla.

BstZ17I-FRT-Gt-F (SEQ ID N°45)

TCCCCCGGGGTATACTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTC
TAGAGAATAGGAAGTTCGGAATAGGAAGTTCATTTAGATGGGTACCGAGCT
CGAATTG

con

- secuencia en mayúsculas subrayadas para los sitios de restricción *SmaI* y *BstZ17I* y bases adicionales,
- secuencia en mayúsculas y negrita correspondiente a la secuencia FRT (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)
- secuencia en mayúsculas homóloga a la secuencia del gen de gentamicina situado sobre *p34S-Gm* (Dennis et Ziltra, AEM julio 1998, p 2710-2715).

HindIII-FRT-Gt-R (SEQ ID N°45)

CCCAAGCTTCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTC
TCTAGAAAGTATAGGAAGTTCGGCGCGGATGGGTACCGAGCTCGAATTG

con

- secuencia en mayúsculas subrayadas para el sitio de restricción *HindIII* y bases adicionales,
- secuencia en mayúsculas y negrita correspondiente a la secuencia FRT (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)
- secuencia en mayúsculas homóloga a la secuencia del gen de gentamicina situado sobre *p34S-Gm* (Dennis y Ziltra, AEM julio 1998, p 2710-2715).

El producto de PCR FRT-Gt-FRT se digirió mediante *BstZ17I* e *HindIII* y se clonó entre los sitios *BstZ17I* e *HindIII* de *pMA-ΔCP4-6::TT02-MCS* descrito en las solicitudes de patente EP10306164.4 y US61/406249. El plásmido resultante se verificó mediante secuenciación de ADN y se denominó *pMA-ΔCP4-6::TT02-MCS-Gt*.

Construcción de *pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔCP4-6::TT02-SMC::Gt*

Para construir pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔCP4-6::TT02-SMC::Gt, el fragmento de *StuI/BsrBI* ΔCP4-6::TT02-SMC::Gt purificado de pMA-ΔCP4-6::TT02-MCS::Gt, descrito anteriormente, se clonó entre los sitios *EcoRI* del plásmido pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm que se ha tratado mediante fragmento (de Klenow) grande de ADN polimerasa I de *E. coli*. El plásmido resultante se verificó mediante secuenciación y se denominó pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔCP4-6::TT02-SMC::Gt

Para construir el plásmido final pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Gt, el fragmento de *Apal/BamHI* TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 purificado de pUC 18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm, descrito anteriormente, se clonó entre los sitios *Apal/BamHI* del plásmido pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔCP4-6::TT02-SMC::Gt. El plásmido resultante se verificó mediante secuenciación y se denominó pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Gt

4.1.2. Construcción del plásmido pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔmelB::TT02-SMC

Para construir el fragmento ΔmelB::TT02-MCS, se realizó PCR de solapamiento entre la región aguas arriba de *melB* (upmelB), el terminador de la transcripción TT02, el sitio de clonación múltiple (MCS) y la región aguas abajo de *melB* (downmelB).

En primer lugar, el fragmento upmelB-TT02-MCS se amplificó a partir de ADN genómico de *E. coli* MG1655 usando los cebadores Ome 1841-Sfol-KpnI-DmelB amont-F (SEQ ID N°46) y Ome 1842-SMC-TT02-DmelB amont-R (SEQ ID N°47) mediante PCR. A continuación, el fragmento TT02-MCS-downmelB se amplificó a partir de ADN genómico de *E. coli* MG1655 usando los cebadores Ome 1843-TT02-SMC-DmelB aval-F (SEQ ID N°48) y Ome 1844-Sfol-KpnI-DmelB aval-R (SEQ ID N°49) mediante PCR. Los cebadores Ome 1842-SMC-TT02-DmelB amont-R (SEQ ID N°47) y Ome 1843-TT02-SMC-DmelB aval-F (SEQ ID N°48) se han diseñado para solaparse a través de una región de 36 nucleótidos de longitud. Finalmente, el fragmento upmelB-TT02-MCS-downmelB se amplificó al mezclar los amplicones upmelB-TT02-MCS y TT02-MCS-downmelB y usar los cebadores Ome 1841-Sfol-KpnI-DmelB amont-F (SEQ ID N°46) y Ome 1844-Sfol-KpnI-DmelB aval-R (SEQ ID N°49). El producto de PCR de fusión resultante se digirió mediante *SfoI* y se clonó entre los sitios *EcoRI* del plásmido pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm, descrito anteriormente, que se ha tratado mediante fragmento (de Klenow) grande de ADN polimerasa I de *E. coli*. El plásmido resultante se verificó mediante secuenciación de ADN y se denominó pUC18-TTadc-Cl*0-PlambdaR*(-35)-ΔmelB::TT02-MCS.

Ome 1841-Sfol-KpnI-DmelB amont-F (SEQ ID N°46)

CGTAGGCGCCGGTACCGACCTCAATATCGACCCAGCTACGC

con

- mayúsculas subrayadas correspondientes a los sitios de restricción *SfoI* y *KpnI* y bases adicionales,
- secuencia en mayúsculas homóloga a la secuencia aguas arriba del gen *melB* (4340489-4340513, secuencia de referencia en el cbersito <http://ecogene.org/>)

Ome 1842 (SMC-TT02-DmelB amont-R) (SEQ ID N°47)

GCTTGTATACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTTCG

TTTTATTTGATGCATTGAAATGCTCATAGGGTATCGGGTTCGC

con

- secuencia en mayúsculas subrayadas para el sitio de restricción *BstZ17I* y el principio de un sitio de clonación múltiple,
- secuencia en mayúsculas correspondiente al terminador de la transcripción T1 de *rrnB* de *E. coli* (Orosz A, Boros I y Venetianer P. Eur. J. Biochem. 1991 Nov 1;201(3):653-9)
- secuencia en mayúsculas y negrita homóloga a la secuencia aguas abajo del gen *melB* (4341377-4341406, secuencia de referencia en el cbersito <http://ecogene.org/>).

Ome 1843 (TT02-SMC-DmelB aval-F) (SEQ ID N°48)

AGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTATACAAGCTTAATTAACCTAGGGCC
CGGGCGGATCCGTGAGTGATGTGAAAGCCTGACGTGG

con

- 5 - secuencia en mayúsculas correspondiente al terminador de la transcripción T1 de *rrnB* de *E. coli* (Orosz A, Boros I y Venetianer P. Eur. J. Biochem. 1991 Nov 1;201(3):653-9)
- secuencia en mayúsculas y negrita que contiene un sitio de clonación múltiple: *Bst*Z17I, *Hind*III, *Avr*II, *Apal*, *Bam*HI,
- secuencia en mayúsculas subrayadas homóloga a la secuencia aguas abajo del gen *melB* (4342793-4342818, secuencia de referencia en el cbersitio <http://ecogene.org/>).

10 Ome 1844 (SfoI-KpnI-DmelB aval-R) (SEQ ID N°49)

CGTAGGCGCCGGTACCCGAACTGCACTAAGTAACCTCTTCGG

- mayúsculas subrayadas correspondientes a los sitios de restricción *Sfo*I y *Kpn*I y bases adicionales,
- secuencia en mayúsculas homóloga a la secuencia aguas arriba del gen *melB* (4343694-4343719, secuencia de referencia en el cbersitio <http://ecogene.org/>)

15 4.1.3. Construcción del plásmido pUC18-*TTad*c-*Cl**0-*PlambdaR**(-35)- Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt

Para construir pUC18-*TTad*c-*Cl**0-*PlambdaR**(-35)- Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt, el fragmento de *Bst*Z17I/*Bam*HI *PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt purificado de pUC18-*TTad*c-*Cl**0-*PlambdaR**(-35)- Δ CP4-6::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt, descrito anteriormente, se clonó entre los sitios *Bst*Z17I/*Bam*HI del plásmido pUC18-*TTad*c-*Cl**0-*PlambdaR**(-35)- Δ *melB*::*TT02-SMC*, descrito anteriormente. El plásmido resultante se verificó mediante secuenciación y se denominó pUC18-*TTad*c-*Cl**0-*PlambdaR**(-35)- Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt.

25 4.2. Construcción de la cepa MG1655 *metA**11 Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt pKD46

Para reemplazar el gen *melB* por la región *TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt, pUC18-*TTad*c-*Cl**0-*PlambdaR**(-35)- Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt se digirió mediante las enzimas de restricción *Ahd*I y *Sph*I y el fragmento digerido Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt restante se introdujo en la cepa MG1655 *metA**11 pKD46 según el Protocolo 1.

35 Se seleccionaron recombinantes resistentes a gentamicina y la presencia de la modificación cromosómica Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt se verificó mediante PCR con los cebadores Ome 1845-DmelB-verif1-F (SEQ ID N°50) y Ome 1846-DmelB-verif2-R (SEQ ID N°51) (Tabla 7) y mediante secuenciación de ADN. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA**11 Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt (pKD46).

4.3. Transducción de Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt en la cepa 5

40 La modificación cromosómica Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt se transdujo en la cepa 5 (Tabla 6), descrita anteriormente, con un lisado de fago P1 procedente de la cepa MG1655 *metA**11 pKD46 Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt descrita anteriormente, según el Protocolo 2.

Se seleccionaron transductantes resistentes a gentamicina y la presencia de la modificación cromosómica Δ *melB*::*TT02-TTad*c-*PlambdaR**(-35)-*RBS01-thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11::Gt se verificó mediante PCR con Ome

1845-DmelB-verif1-F (SEQ ID N°50) y Ome 1846-DmelB-verif2-R (SEQ ID N°51) (Tabla 7). La cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm ΔyjbI::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Tc ΔmelB::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ::Gt resultante se denominó cepa 6.*

5. Construcción de la cepa 8: MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF ΔmetJ ΔpykF ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE pBeloBAC11-PL1*1/RBS01*2-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ*

5.1. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF ΔmetJ ΔpykF ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE*

Las modificaciones cromosómicas del promotor *Ptrc-metH*, *PtrcF-cysPUWAM*, *PtrcF-cysJIH*, *Ptrc09-gcvTHP* y *Ptrc36-ARNmst17-metF*, que se han descrito en las solicitudes de patente WO2007/077041 y WO2009/043803, y las supresiones de los genes *ΔmetJ*, *ΔpykF*, *ΔpurU* y *ΔyncA*, que se han descrito en las solicitudes de patente WO2007/077041, WO2009/043803 y WO2005/111202, se transdujeron en una cepa que contenía alelos *metA*11* que codifica una homoserina succiniltransferasa con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina según se describe en el documento WO2005/111202, según el Protocolo 2.

El casete de resistencia, asociado cada modificación cromosómica o supresión durante la construcción de la cepa, se ha retirado según el Protocolo 1.

La modificación cromosómica *ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km* se transdujo en la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF ΔmetJ ΔpykF ΔpurU ΔyncA* con un lisado de fago P1 procedente de la cepa MG1655 *metA*11 pKD46 ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km* descrita en las solicitudes de patente EP10306164.4 y US61/406249, según el Protocolo 2.

Se seleccionaron transductantes resistentes a kanamicina y la presencia de la modificación cromosómica *ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km* se verificó mediante PCR con los cebadores Ome 0826-malS-F (SEQ ID N°52) y Ome 0827-malS-R (SEQ ID N°53) (Tabla 7). La cepa resultante tiene el genotipo MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF ΔmetJ ΔpykF ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km*

Finalmente, la resistencia a kanamicina de la cepa anterior se retiró según el Protocolo 1. La pérdida del casete resistente a kanamicina se verificó mediante PCR al usar los cebadores Ome 0826-malS-F (SEQ ID N°52) y Ome 0827-malS-R (SEQ ID N°53). La cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF ΔmetJ ΔpykF ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* resultante se denominó cepa 7.

5.1.1. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF ΔmetJ ΔpykF ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE pBeloBAC11-PL1*1/RBS01*2-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ*

Construcción del plásmido *pBeloBAC11-PL1*1/RBS01*2-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ*

El plásmido *pBeloBAC11-PL1*1/RBS01*2-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ* se deriva del plásmido *pBeloBAC11-PT7/RBST7-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ* descrito en el ejemplo 2 de esta solicitud de patente.

Para construir el plásmido *pBeloBAC11-PL1*1/RBS01*2-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ*, el plásmido *pBeloBAC11-PT7/RBST7-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ* se amplificó con los cebadores Ome 2012-Sfol-HpaI-AvrII-PL1*1/RBS01*2-thrA*1-F (SEQ ID N°54) y Ome 0625-Ptrc-cysE*rec (SEQ ID N°55). El fragmento PL1*1/RBS01*2-thrA*1 digerido con *HpaI/NheI* se clonó entre los sitios *HpaI* y *NheI* del plásmido *pBeloBAC11-PT7/RBST7-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ* descrito en el ejemplo 2 de esta solicitud de patente. El plásmido resultante se verificó mediante secuenciación de ADN y se denominó *pBeloBAC11-PL1*1/RBS01*2-thrA*1-SMC-cysE-PgapA-metA*11-T7TΦ*.

Ome 2012 Sfol-HpaI-AvrII-PL1*1/RBS01*2-thrA*1-F (SEQ ID N°54)

TGCCGGCACGGCGCCAAGTTAACCCTAGGTTATCTCTGGCGGTGTTGACATA
AATACCACTGGCGGTTATACTGAGCACAtcaacTAAGGAGGTTATAAATGAGAGT
 GTTGAAGTTCG

con

- mayúsculas subrayadas correspondientes a los sitios de restricción *SfoI*, *HpaI* y *AvrII* y bases adicionales,
- 5 - secuencia en mayúsculas y negrita correspondiente a una forma corta de promotor P_L de bacteriófago lambda (P_{L1} Giladi y cols, FEMS Microbiol Rev. agosto 1995; 17(1-2):135-40) y que aloja una mutación en las cajas -10 (G-12T descrita en Kincade & deHaseth, Gene. 2 de enero de 1991;97(1):7-12). Este promotor se denomina PL1*1).
- minúsculas: cinco bases que separan el sitio de inicio de la transcripción de PL1*1 y el sitio de unión al ribosoma RBS01*2
- 10 - mayúsculas cursivas correspondientes a la secuencia RBS01*2
- secuencia en mayúsculas subrayadas homóloga al gen *thrA*1* (337-354, secuencia de referencia en el cibernsio <http://ecogene.org/>).

Ome 0625 Ptrc-cysE*rec (SEQ ID N°55)

CCGGGTCAGCGGCGTAGGC

- 15 homóloga al gen *cysE* (3780360-3780378, secuencia de referencia en el cibernsio <http://ecogene.org/>)

El pBeloBAC11-PL1*1/RBS01*2-*thrA*1*-SMC-*cysE*-PgapA-*metA*11*-T7TΦ, descrito anteriormente, se introdujo mediante electroporación en la cepa 7 (Tabla 6). La presencia del plásmido pBeloBAC11-PL1*1/RBS01*2-*thrA*1*-SMC-*cysE*-PgapA-*metA*11*-T7TΦ se verificó y la cepa MG1655 *metA*11* Ptrc-*metH* PtrcF-*cysPUWAM* PtrcF-*cysJIH* Ptrc09-*gcvTHP* Ptrc36-ARNmst17-*metF* Δ*metJ* Δ*pykF* Δ*purU* Δ*yncA* Δ*malS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* pBeloBAC11-PL1*1/RBS01*2-*thrA*1*-SMC-*cysE*-PgapA-*metA*11*-TT01 resultante se denominó cepa 8.

Tabla 7: Cebadores usados para verificaciones por PCR de las modificaciones cromosómicas descritas anteriormente

Nombre de los genes	Nombre de los cebadores	SEQ ID N°	Localización de la homología con la región cromosómica	Secuencias
wcaM	Ome1707-DwcaM_verif_F	30	2115741-2115762	GCCGTTCAACACTGGCTGGAC G
	Ome1708-DwcaM_verif_R	31	2110888-2110907	TGCCATTGCAGGTGCATCGC
yjbl	Ome1856-Dyjbl-verif1-F	40	4247754-4247774	CAGACCACCCAACTGGCGACC
	Ome1857-Dyjbl-verif2-R	41	4251489-4251508	GCCATTGGAATCGACCAGCC
	Ome 1838-K7-FRT-Tc-seq-F	42		GGTTGCTGGCGCCTATATCGC
	Ome 1815-metA*11-seq-F	43	4212634-4212658	GCCTGGTGGAGTTTAATGATG TCGC
melB	Ome 1845-DmelB-verif1-F	50	4340168-4340187	GCCGATTTTGTCTGGTGGC
	Ome 1846-DmelB-verif2-R	51	4344044-4344065	GCCGGTTATCCATCAGGTTCA C
malS	Ome0826-malS-F	52	3734778-3734800	GGTATTCCACGGGATTTTTCGC G
	Ome0827-malS-R	53	3738298-3738322	CGTCAGTAATCACATTGCCTG TTGG

5 Ejemplo IV: Evaluación de la producción de metionina dependiente de la temperatura de las cepas 3, 4, 5 y 6

Las cepas de producción se evaluaron en matraces Erlenmeyer pequeños. Un precultivo de 5,5 ml se hizo crecer durante 21 horas en un medio mixto (10 % de medio LB (Sigma 25 %) con 2,5 g.l⁻¹ de glucosa y 90% de medio mínimo PC1). Se usó para inocular un cultivo de 50 ml hasta una OD₆₀₀ de 0,2 en medio PC1. Cuando era necesario, se añadía gentamicina a una concentración de 10 mg.l⁻¹, cloranfenicol a 30 mg.l⁻¹ y tetraciclina a 5 mg.l⁻¹. Cuando el cultivo hubo alcanzado una OD₆₀₀ de 5 a 7, los aminoácidos extracelulares se cuantificaron mediante HPLC después de la derivación por OPA/Fmoc y otros metabolitos pertinentes se analizaron usando HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa) y GC-MS después de la sililación.

Las condiciones de cultivo y precultivo se muestran en las tablas posteriores. Los precultivos se hicieron crecer bien a 30°C o bien a 37°C. Los cultivos se hicieron crecer bien a 30°C o 37°C o bien a 37°C durante 2 horas, a continuación a 42°C durante 2 horas y finalmente 37°C durante el resto del cultivo.

Tabla 8: Composición del medio mínimo (PC1).

Compuesto	Concentración (g.l ⁻¹)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080
H ₃ BO ₃	0,0010
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0004
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00
Ácido cítrico	6,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04
K ₂ HPO ₄	8,00
Na ₂ HPO ₄	2,00
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8,00
NH ₄ Cl	0,13
NaOH 4M	Ajustado hasta pH 6,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,04
Tiamina	0,01
Glucosa	15,00
Tiosulfato amónico	5,60
Vitamina B 12	0,01
MOPS	15,00

5 **Tabla 9:** Rendimiento de metionina (R_{met}) en % g de metionina /g de glucosa producido en cultivo discontinuo por la cepa 3. Para la definición precisa del rendimiento de metionina/glucosa, véase posteriormente. DE indica la desviación estándar para los rendimientos que se calculaba sobre la base de varias repeticiones (n = número de repeticiones). Se probaron diferentes condiciones de cultivo. Se indican en la tabla; PC significa precultivo y C significa cultivo.

Condiciones de crecimiento de precultivos y cultivos de la cepa 3	R_{met}	DE
Cepa 3 - PC 30°C/ C 30°C	7.9	0.5
(n=4)		
Cepa 3 - PC 30°C/C 37°C	9.0	1.0
(n=34)		
Cepa 3 - PC 30°C /C 37-42-37°C	9.2	1.2
(n=86)		
Cepa 3 - PC 37°C/C37°C	7.9	0.1
(n=3)		

10 Como se muestra en la tabla 9, la termoinducción de la expresión de los genes *thrA*1* y *cysE* durante el procedimiento de cultivo incrementa la cantidad de metionina producida. La expresión constitutiva a lo largo del procedimiento de cultivo da como resultado un rendimiento de metionina bajo.

15 Para una producción óptima de metionina, las mejores condiciones de cultivo son 30°C para el precultivo seguido por un cultivo a 37°C (2 h), 42°C (2 h), 37°C. En estas condiciones, la cepa 3 producía metionina con un rendimiento de 9,2%.

Tabla 10: Rendimiento de metionina (R_{met}) en % g de metionina /g de glucosa producido en cultivo discontinuo por las cepas 4, 6 y 6. Para la definición precisa del rendimiento de metionina/glucosa, véase posteriormente. DE indica la desviación estándar para los rendimientos que se calculaba sobre la base de varias repeticiones (n = número de repeticiones). Los precultivos se cultivaron a 30°C y el cultivo a 37°C durante 2 horas, 42°C durante 2 horas y 37°C hasta el final del cultivo.

Cepa y condición de crecimiento	R_{met}	DE
Cepa 4 - PC 30°C /C 37-42-37°C (n=11)	9,7	1,7
Cepa 5 - PC 30°C /C 37-42-37°C (n=9)	10,6	1,3
Cepa 6 - PC 30°C /C 37-42-37°C (n=3)	11,7	0,1

Las cepas 4, 5 y 6 se cultivaron todas en condiciones para la producción óptima de metionina.

Como se muestra en la tabla 10, la termoinducción de la expresión de los genes *thrA*1* y *cysE* durante el procedimiento de cultivo incrementa la producción proporcionalmente al número de copias de los genes controlados por el promotor inducible. En efecto, la cepa 6 que posee siete copias de *thrA*1* bajo el control del promotor Plambda (véase la tabla 6) producía metionina con un rendimiento superior que las cepas 5 (6 copias de *thr*1*) y 4 (5 copias).

Es notable precisar que las cepas 5 y 6 no pueden crecer a una temperatura constante de 37°C. En conclusión, estos resultados demuestran que la termoinducción no solo es mejor para la producción sino también esencial en este caso.

La concentración de metionina extracelular se cuantificó mediante HPLC después de la derivación con OPA/FMOC. La concentración de glucosa residual se analizó usando HPLC con detección refractométrica. El rendimiento de metionina se expresó como sigue:

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

Para validar la termoinducción de la expresión de los genes *thrA*1* y *cysE*, las actividades de las enzimas correspondientes se determinaron en extractos brutos.

Para la determinación de las actividades enzimáticas in vitro, cepas de *E. coli* se cultivaron en medio mínimo según se describe anteriormente y se recogieron al final de la fase de crecimiento exponencial mediante centrifugación. Las pellas se resuspendieron en tampón de fosfato potásico 20 mM (pH 7,2) frío que contenía un comprimido de cóctel inhibidor de proteasa con EDTA. A continuación, las células se sometieron a lisis 1x30 s a 6500 rpm al batir con cuentas con un sistema Precellys (Bertin Technologies) seguido por centrifugación a 12000 g (4°C) durante 30 minutos. Los sobrenadantes se desalaron y se usaron para el análisis. Las concentraciones de proteína se determinaron usando reactivo de ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

Para la determinación de la actividad de HDH (homoserina deshidrogenasa, codificada por *thrA*1*) in vitro, 15 µg de extracto celular bruto se ensayaron en 100 mM de Tris-HCl pH 9, 150 mM de KCl, 1 mM de NADP⁺ y 25 mM de L-homoserina. La reducción de NADP⁺ en presencia de L-homoserina se comprobó espectrofotométricamente durante 30 minutos a 340 nm.

La actividad de SAT (serina acetiltransferasa, codificada por *cysE*) se ensayó espectrofotométricamente a 25°C al medir la absorbancia de TNB a 408 nm durante 10 minutos, debido a la reacción de CoA con DTNB. La reacción se realizó con 2 µg de extractos brutos en 80 mM de fosfato potásico pH 7,5, 2 mM de acetil-coA, 30 mM de serina y 0,1 mM de DTNB.

Tabla 11: Las actividades de homoserina deshidrogenasa (HDH, *thrA*1*) y serina acetiltransferasa (SAT, *cysE*) se determinaron sobre los extractos brutos de cultivos de la cepa 3 desarrollada en diferentes condiciones. Las actividades se dan en mUI/mg de proteínas. Las desviaciones estándar se calcularon sobre la base de varios cultivos independientes (N = número de repeticiones).

Condiciones de crecimiento de precultivos y cultivos de la cepa 3	HDH	SAT	N
Precultivo 30°C + Cultivo 30°C	78 ± 28	99 ± 10	6
Precultivo 30°C + Cultivo 37°C	104 ± 21	153 ± 28	18
Precultivo 30°C + Cultivo 37/42/37°C	195 ± 33	324 ± 32	16
Precultivo 37°C + Cultivo 37°C	94 ± 25	181 ± 20	6

La tabla 11 muestra que durante la inducción, se incrementan las actividades de HDH y SAT. La expresión constitutiva de *thrA*1* y *cysE* da como resultado niveles de actividades de HDH y SAT que están entre las condiciones no inducidas e inducidas, explicando en parte el rendimiento inferior de metionina. En conclusión, estos resultados demuestran que la inducción de *thrA*1* y *cysE* es ciertamente beneficiosa para incrementar el rendimiento de metionina.

Del mismo modo para las cepas 4, 5 y 6, las actividades de HDH y SAT se incrementaban durante la inducción. Las actividades se incrementan proporcionalmente con el número de copias de los genes *thrA*1* y *cysE* integrados en el cromosoma (datos no mostrados).

Ejemplo V: Evaluación de la producción dependiente de la temperatura de la cepa 8

La cepa 8 se evaluó en matraces Erlenmeyer pequeños como se describe en el ejemplo IV. Se comparó con la cepa 3.

Tabla 12: Rendimiento de metionina (R_{met}) en % g de metionina /g de glucosa producido en cultivo discontinuo por las cepas 8 y 3. Para la definición precisa del rendimiento de metionina/glucosa, véase posteriormente. DE indica la desviación estándar para los rendimientos que se calculaba sobre la base de varias repeticiones (n = número de repeticiones). Los precultivos se cultivaron a 30°C y el cultivo a 37°C durante 2 horas, 42°C durante 2 horas y a continuación 37°C hasta el final del cultivo.

Condiciones de crecimiento de las cepas 3 y 8	R_{met}	DE
Cepa 8 - PC 30°C /C 37-42-37°C (n=3)	9,5	0,1
Cepa 3 - PC 30°C /C 37-42-37°C (n=3)	8,6	0,5

Según se muestra en la tabla 12, la producción de metionina durante la inducción es tan buena para la cepa 8 que soporta la construcción PL1*1/RBS01*2-*thrA*1*-SMC-*cysE* como para la cepa 3 que soporta 4 copias de la construcción PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA*1*-*cysE*.

La concentración de metionina extracelular se cuantificó mediante HPLC después de la derivación con OPA/FMOC. La concentración de glucosa residual se analizó usando HPLC con detección refractométrica. El rendimiento de metionina se expresó como sigue:

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

Para validar la termoinducción de la expresión de los genes *thrA*1* y *cysE* controlados por el promotor PL1*1, las actividades de las enzimas correspondientes se determinaron en extractos brutos según se describe en el ejemplo IV.

Tabla 13: Las actividades de homoserina deshidrogenasa (HDH, *thrA*1*) y serina acetiltransferasa (SAT, *cysE*) se determinaron en los cultivos descritos anteriormente y se dieron en mUI/mg de proteínas. Las desviaciones estándar se calcularon sobre la base de varios cultivos independientes (N = número de repeticiones).

Condiciones de crecimiento de la cepa 3 y 8	HDH	SAT	N
Cepa 8- Precultivo 30°C + Cultivo 37/42/37°C	91 ± 8	140 ± 2	3
Cepa 3 - Precultivo 30°C + Cultivo 37/42/37°C	100 ± 3	140 ± 10	2

5 Como se puede observar en la tabla 13, las actividades de HDH y SAT de la cepa 8 eran similares a las de la cepa 3. Como resultado, la inducción a partir de PL1*1/RBS01*2-*thrA*1*-SMC-*cysE* es al menos equivalente a la inducción a partir de 4 copias de PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA*1*-*cysE*.

REFERENCIAS

- 10 Saunderson, C.L., (1985) British Journal of Nutrition 54, 621-633.
- "Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of Escherichia coli." Tang X, Tan Y, Zhu H, Zhao K, Shen W. Appl Environ Microbiol. 2009 Mar; 75(6):1628-34.
- "A genetic switch". Ptashne M. Blackwell Scientific, Cambridge, MA. 1986.
- 15 "A genetic switch: Phage lambda revisited". Ptashne M. Cold Spring Harbor Lab Press. Cold Spring Harbor, NY. 2004.
- "The bacteriophages, Part II: Life of phages, 8". Gene regulatory circuitry of phage λ. Little J. 2ª edición 2004. Richard Calendar.ed. Oxford University Press.
- "On a thermosensitive repression system in the Escherichia coli lambda bacteriophage". Sussman R, Jacob F. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 1962, 254, p1517.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> METABOLIC EXPLORER FIGGE, Rainer VASSEUR, Perrine	
	<120> USO DE PROMOTORES INDUCIBLES EN LA PRODUCCIÓN DE METIONINA	
	<130> D27269	
5	<150> PCT/IB2009/056033	
	<151> 2009-12-14	
	<160> 55	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
10	<211> 117	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Ptrc07-serBF	
15	<400> 1	
	ccaccctttg aaaatttgag acttaatggt gccagaagca atggatacaa ggtagcctca	60
	tgctcacact ggctcacctt cgggtgggcc tttctgccat atgaatatcc tccttag	117
	<210> 2	
	<211> 123	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Ptrc07-serBR	
	<400> 2	
	cgcaccaggt aatgttaggc attaaggctc ctgtaaaatc gttcgaagca gggaaaataa	60
	cttcacaca ttatacgagc cggatgatta atcgccaaca gctttaggc tggagctgct	120
	tcg	123
25	<210> 3	
	<211> 19	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido serBF	
5	<400> 3	
	caaggcaaga cagaacagg	19
	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido serBR	
	<400> 4	
	ggcatcactt catcaccac	19
15	<210> 5	
	<211> 82	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido Apal-TTadc-CI857-F-1	
	<400> 5	
	accttgccga gggccctaaa aataagagtt accttaaag gtaactctta ttttttttat	60
	cagccaaacg tctcttcagg cc	82
	<210> 6	
	<211> 95	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

ES 2 634 469 T3

<223> Oligonucleótido PlambdaR-thrA-R-2

<400> 6

caacactctc atatgacctc cttagtacat gcaaccatta tcaccgccag aggtaaaatt 60

gtcaacacgc acggtgtag atatttatcc ctg 95

<210> 7

5 <211> 61

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido PlambdaR-thrA-F-3

10 <400> 7

gcatgtacta aggaggtcat atgagagtgt tgaagttcgg cgtacatca gtggcaaatg 60

c 61

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido cysE-R-4

<400> 8

agcttgcatt cctgcaggtc g 21

20 <210> 9

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido Smal-PgapA-F

<400> 9

acgtcccgga caagccaaa ggaagagtga ggc 33

<210> 10

<211> 67

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido PgapA-metA*11-R

<400> 10

ggcgggtagc tcgtccggca cacgaatcgg catatatcc accagctatt tgtagtgaa 60

taaaagg 67

<210> 11

10 <211> 67

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido PgapA-metA*11-F

15 <400> 11

ccttttattc actaacaat agctggtgga atatatgccg attcgtgtgc cggacgagct 60

acccgcc 67

<210> 12

<211> 47

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido BamHI-metA*11-R

<400> 12

acgtgatcc gaattccgac tatcacagaa gattaatcca gcgttg 47

25 <210> 13

<211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido SnaBI-thrA-SMC-cysE-F

<400> 13

tgctacgtac cctctcatgg aagttaggag tctgagctag ctagtccgct cgagatacga 60

5 aagaagtccg cgaactgg 78

<210> 14

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Oligonucleótido cysE-R

<400> 14

caaccagtga ccgatgcg 18

<210> 15

15 <211> 139

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sfol-PT7-RBST7-NdeI-thrA-F

20 <400> 15

ggcgcctcga ttcgaacttc tgatagactt cgaaattaat acgactcact ataggagagac 60

cacaacggtt tccctctaga aataattttg tttaacttta agaaggagat atacatatga 120

gagtgttgaa gttcggcgg 139

<210> 16

<211> 139

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido metA-T7T?-Sfol-R

<400> 16

ggcgcccttt cagcaaaaaa cccctcaaga cccgtttaga ggccccaag	60
ggttatgcta gttattgctc agcgggtggca gcagccaact cagcttcctt tcgggctttg ttagttaatc	120
cagcgttga ttcattgtgc	139

<210> 17

5 <211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido HindIII-upmaIS-F-1

10 <400> 17

atcgtaaagc tttcacttt acctggcgca ttgg	34
--------------------------------------	----

<210> 18

<211> 45

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido upmaIS-Km-R-2

<400> 18

ctaaggagga tattcatatg accggttcgg cggcgttctg gatgg	45
---	----

20 <210> 19

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido upmaIS-Km-F-3

<400> 19

ccatccagaa cgccgccgaa ccggtcatat gaatatcctc ctag	45
--	----

<210> 20

<211> 65

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido Km-SMC-R-4

<400> 20

gatcgaatgga tccatctcga gatccgcgga tgtatacatg ggccctgtag gctggagctg 60

cttcg 65

<210> 21

10 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido downmaIS-F-1

15 <400> 21

atgctgaatt caccggtgaa gcctggggcc acggcg 36

<210> 22

<211> 39

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido downmaIS-R-2

<400> 22

tacgatgaat tcgggacgcc ataagcgta tcaatcacc 39

25 <210> 23

<211> 925

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido TTadc-CI857*-PlambdaR*(-35)-RBS01-SMC-TT07

<400> 23

	gggccctaaa aataagagtt accttaaattg gtaactctta ttttttttat taattaacct	60
	aggtcagcca aacgtctctt caggccactg actagcgata actttcccca caacggaaca	120
	actctcattg catgggatca ttgggtactg tgggtttagt ggttgtaaaa acacctgacc	180
5	gctatccctg atcagtttct tgaaggtaaa ctcatcacc ccaagtctgg ctatgcagaa	240
	atcacctggc tcaacagcct gctcagggtc aacgagaatt aacattccgt caggaaagct	300
	tggcttggag cctgttgggt cggtcatgga attaccttca acctcaagcc agaatgcaga	360
	atcactggct tttttggttg tgcttaccca tctctcogca tcacctttgg taaaggttct	420
	aagcttaggt gagaacatcc ctgcctgaac atgagaaaa acaggtact catactcact	480
	tctaagtgac ggctgcatgc taaccgcttc atacatctcg tagatttctc tggcgattga	540
	agggctaaat tcttcaacgc taactttgag aatttttgta agcaatgcgg cgttgtaagc	600
	atttaaatgca ttgatgccat taaataaagc accaaccgct gactgcccc tccccatctt	660
	gtctgcgaca gattcctggg ataagccaag ttcatttttc tttttttcat aaattgcctt	720
	aaggcgacgt gcgtcctcaa gctgctcttg tgtaaatggt ttcttttttg tgctcatcct	780
	aggaatctat caccgcaagg gataaatatc taacaccgtg cgtgttgaca attttacctc	840
	tggcggtgat aatggttgca tgtactaagg aggttataag tatactcaca ctggctcacc	900
	ttcgggtggg cctttctgcg gatcc	925

<210> 24

<211> 135

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido AvrII-PlambdaR03-RBS01-T7RNApol-F

<400> 24

	ctcatcctag gaatctatca ccgcaaggga taaatatcta acaccgtgcg tgttgatcat	60
	tttacctctg gcggtgataa tgggtgcatg tactaaggag gttataaatg aacacgatta	120
15	acatcgctaa gaacg	135

<210> 25

<211> 84

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido T7RNApol-BstZ17I-TT07-BamHI-XhoI-R

<400> 25

cggccagctc gagcgcgat ccgcagaaag gccacccga aggtgagcca gtgtgagtat 60

acttacgcga acgcgaagtc cgac 84

<210> 26

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido malS-F

<400> 26

15 gcaccaacaa cgcttcaggc 20

<210> 27

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido Km-R

<400> 27

tgtaggctgg agctgcttcg 20

<210> 28

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido T7RNApol-F

<400> 28

gctgctaagc tgctggctgc 20

5 <210> 29

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido malS-R

<400> 29

ggaaagactc atgcacagc 19

<210> 30

<211> 22

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ome1707-DwcaM-verif-F

<400> 30

20 gccgttcaac actggctgga cg 22

<210> 31

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótido

<400> 31

tgccattgca ggtgcatcgc 20

<210> 32

<211> 914

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Plásmido pMA-RQ-TTadc-CI*3-PlambdaR*(-35)-RBS01*2

<400> 32

ggccgtcaag gccgcatggc ggccttata acctccttag tacatgcaac cattatcacc	60
gccagaggtta aaattgtcaa cacgcacggt gttagatatt tatcccttgc ggtgatagat	120
ttaacgtatg agcacaaaaa agaaaccatt aacacaagag cagcttgagg acgcacgtcg	180
ccttaaggca attcatgaaa aaaagaaaaa tgaacttggc ttatcccagg aatctgtcgc	240
agacaagatg gggatggggc agtcaggcgt tgggtcttta ttaaatggca tcaatgcatt	300
aaatgcttac aacgccgat tgcttgcgaa aattctcaaa gttagcgttg aagaatttag	360
cccttcaatc gccagagaaa tctacgagat gtatgaagcg gttagcatgc agccgtcact	420
tagaagtgag tatgagtacc ctgttttttc tcatgttcag gcagggatgt tctcacctga	480
acttagaacc tttaacaaag gtgatgcgga gagatgggta agcacaacca aaaaagccag	540
tgattctgca ttctggcttg aggttgaagg taattccatg accgcaccaa caggctccaa	600
gccaagcttt cctgacggaa tgtaattctt cgttgacctt gagcaggctg ttgagccagg	660
tgatttctgc atagccagac ttgggggtga tgagtttacc ttcaagaaac tgatcaggga	720
tagcggtcag gtgtttttac aaccactaaa cccacagtac ccaatgatcc catgcaatga	780
gagttgttcc gttgtgggga aagttatcgc tagtcagtgg cctgaagaga cgtttggctg	840
ataaaaaaaaa taagagttac catttaaggt aactcttatt tttagggccc ttaattaact	900
gggcctcatg ggcc	914

<210> 33

10 <211> 914

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plasmid pMA-RQ-TTadc-CI*3-PlambdaR*(-35)-RBS01*2

15 <400> 33

ES 2 634 469 T3

ggccgtcaag gccgcatggc ggccttata acctccttag tacatgcaac cattatcacc 60
gccagaggta aaattgtcaa cacgcacggt gttagatatt tatcccttgc ggtgatagat 120
ttaacgtatg agcacaaaa agaaaccatt aacacaagag cagcttgagg acgcacgtcg 180
ccttaaggca atttatgaaa aaaagaaaa tgaacttggc ttatcccagg aatctgtcgc 240
agacaagatg gggatggggc agtcaggcgt tgggtgcttta tttaatggca tcaatgcatt 300
aaatgcttac aacgccgcat tggcgacaaa aattctcaaa gttagcgttg aagaatttag 360
cccttcaatc gccagagaaa tctacgagat gtatgaagcg gttagcatgc agccgtcact 420
tagaagtgag tatgagtacc ctgttttttc tcatgttcag gcagggatgt tctcacctaa 480

gcttagaacc ttaccaaag gtgatgcgga gagatgggta agcacaacca aaaaagccag 540
tgattctgca ttctggcttg aggttgaagg taattccatg accgcaccaa caggctccaa 600
gccaagcttt cctgacggaa tgtaattct cgttgaccct gagcaggctg ttgagccagg 660
tgatttctgc atagccagac ttgggggtga tgagtttacc ttcaagaaac tgatcaggga 720
tagcggctcag gtgtttttac aaccactaaa cccacagtac ccaatgatcc catgcaatga 780
gagttgttcc gttgtgggga aagttatcgc tagtcagtgg cctgaagaga cgtttggctg 840
ataaaaaaaa taagagttac catttaaggt aactcttatt tttaggggcc ttaattaact 900
gggcctcatg ggcc 914

<210> 34

5 <211> 95

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

10 <400> 34

gcccagctt tgtaggctgg agctgcttcg aagttcctat actttctaga gaataggaac 60
ttcggaatag gaaccggatc aattcatcgc gcgtc 95

<210> 35

<211> 102

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 35

tcccccgggg tataccatat gaatatacctc cttagttcct attccgaagt tcctattctc 60

tagaaagtat aggaacttcg aattgtcgac aagctagctt gc 102

<210> 36

5 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

10 <400> 36

cgtaggcgcc ggtaccgagt gcagatcgcc tggaaggcg 39

<210> 37

<211> 115

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 37

gcttgtatac aacagataaa acgaaaggcc cagtctttcg actgagcctt tcgttttatt 60

tgatgcattt ctgtagaatt ttacacttat agtatcatta ctgattgaga cttca 115

20 <210> 38

<211> 108

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido

<400> 38

	agactggggcc tttcgtttta tctgttgtat acaagcttta cctagggccc ttaattaaat	60
	aatgaataag ggtgtttaag taaaggaaaa catcacggtt cctggcat	108
	<210> 39	
	<211> 42	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 39	
	cgtaggcgcc ggtaccgagc ataatttc accacacatc cg	42
10	<210> 40	
	<211> 109	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido	
	<400> 40	
	tccccgggg tatactgtag gctggagctg cttcgaagtt cctatacttt ctagagaata	60
	ggaacttcgg aataggaact tcatttagat ggtaccgag ctogaattg	109
	<210> 41	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 41	
25	cagaccaccc aactggcgac c	21
	<210> 42	
	<211> 20	

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

5 <400> 42

gccattggaa tcgaccagcc 20

<210> 43

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 43

ggttgctggc gcctatatcg c 21

15 <210> 44

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido

<400> 44

gcctggtgga gtttaatgat gtcgc 25

<210> 45

<211> 101

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 45

cccaagcttc atatgaatat cctccttagt tcctattccg aagttcctat tctctagaaa 60

gtataggaac ttcggcgcg atgggtaccg agctcgaatt g 101

<210> 46

<211> 41

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 46

10 cgtaggcgcc ggtaccgacc tcaatatcga ccagctacg c 41

<210> 47

<211> 95

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido

<400> 47

gcttgtatac aacagataaa acgaaaggcc cagtctttcg actgagcctt tcgttttatt 60

20 tgatgcattg aaatgctcat aggtatcgg gtgcg 95

<210> 48

<211> 90

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótido

<400> 48

	agactgggcc tttcgtttta tctgttgat acaagcttaa ttaacctagg gcccgggcgg	60
	atccgtgagt gatgtgaaag cctgacgtgg	90
	<210> 49	
	<211> 42	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 49	
	cgtaggcgcc ggtacccgaa ctgcactaag taacctctc gg	42
10	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido	
	<400> 50	
	gccgattttg tcgtggtggc	20
	<210> 51	
	<211> 22	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 51	
25	gccggttatc catcagggtc ac	22
	<210> 52	
	<211> 23	

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

5 <400> 52

ggtattccac gggattttc gcg 23

<210> 53

<211> 25

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 53

cgtcagtaat cacattgcct gttgg 25

15 <210> 54

<211> 118

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido

<400> 54

tgccggcacg gcgccaagtt aaccctaggt tatctctggc ggtgttgaca taaataccac 60

tggcggttat actgagcaca tcaactaagg aggttataaa tgagagtgtt gaagttcg 118

<210> 55

<211> 19

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 55

ccgggtcagc ggcgtaggc 19

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de metionina, sus precursores o derivados en un procedimiento fermentativo que comprende las siguientes etapas:

- cultivar un microorganismo modificado en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno, y

- recuperar metionina y/o sus derivados del medio de cultivo,

en donde en dicho microorganismo modificado, la expresión de al menos los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina está bajo el control de un promotor heterólogo inducible por temperatura inducido por la temperatura.

2. El método según la reivindicación 1, en el que la expresión de los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina está bajo el control directo del promotor inducible heterólogo.

3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el promotor inducible por temperatura se selecciona del grupo que consiste en promotores regulados por un represor modificado del fago lambda, el promotor PR o un derivado de PR, el promotor PL o un derivado de PL y un promotor lac modificado regulado por un represor Lac sensible a la temperatura.

4. El método según la reivindicación 3, en el que dicho represor modificado del fago lambda es el alelo del represor lambda cl857 o cualquier otro alelo lábil a la temperatura del represor lambda cl.

5. El método según las reivindicaciones 3 o 4, en el que en la cepa productora se suprime el gen *recA*.

6. El método según la reivindicación 1, en el que la expresión de los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina está bajo el control indirecto del promotor inducible heterólogo, siendo transcritos dichos genes por una ARN polimerasa heteróloga cuya expresión está bajo el control de un promotor inducible.

7. El método según la reivindicación 6, en el que la ARN polimerasa heteróloga se selecciona entre el grupo que consiste en polimerasa de T7 y T3.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el gen *thrA* es un alelo de *thrA* que tiene una sensibilidad de retroalimentación reducida a treonina.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la expresión del gen *metA* está además bajo el control de un promotor inducible heterólogo.

10. El método según la reivindicación 9, en el que el gen *metA* es un alelo mutante de *metA* que codifica con sensibilidad de retroalimentación reducida a metionina y S-adenosilmetionina.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho microorganismo modificado es una *Enterobacteriaceae*, y preferiblemente *Escherichia coli*.

12. Un microorganismo modificado para una producción mejorada de metionina, en donde en dicho microorganismo modificado, la expresión de al menos los genes *thrA* y *cysE* implicados en la producción de metionina está bajo el control de un promotor inducible por temperatura heterólogo inducido por la temperatura.

13. El microorganismo según la reivindicación 12, que comprende al menos una de las modificaciones descritas en las reivindicaciones 2 a 11.

14. El microorganismo según las reivindicaciones 12 o 13, que es una *Enterobacteriaceae*, y preferiblemente *Escherichia coli*.