

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 280**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12P 13/12 (2006.01)
C12R 1/15 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)
C12R 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2011** **PCT/EP2011/068499**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012** **WO12055798**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2011** **E 11772990 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017** **EP 2633037**

54 Título: **Aumento de la disponibilidad de NADPH para la producción de metionina**

30 Prioridad:

25.10.2010 US 406249 P
25.10.2010 EP 10306164

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DISCHERT, WANDA;
VASSEUR, PERRINE;
BOISART, CÉDRIC y
FIGGE, RAINER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 637 280 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aumento de la disponibilidad de NADPH para la producción de metionina.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método para aumentar la disponibilidad de NADPH intracelular producida a partir de NADH para aumentar la producción de metionina. Ventajosamente, el método para aumentar los niveles de NADPH se asocia con un aumento de un metabolismo de carbono para mejorar la producción de metionina.

Antecedentes de la invención

- 10 Los compuestos que contienen azufre tales como cisteína, homocisteína, metionina o S-adenosilmetionina son críticos para el metabolismo celular y se producen a nivel industrial para uso como alimento o aditivos alimentarios y productos farmacéuticos. En particular la metionina, un aminoácido esencial, que no puede ser sintetizado por los animales, cumple una función importante en muchas funciones corporales. Aparte de su función en la biosíntesis de proteínas, la metionina está implicada en la transmetilación y en la biodisponibilidad de selenio y zinc. La metionina se utiliza también directamente como un tratamiento de trastornos como alergia y fiebre reumática. La mayor parte de la metionina producida se añade a pienso animal.

- 15 Con la disminución del uso de proteínas de origen animal como consecuencia de la BSE y de la gripe aviar, ha aumentado la demanda de metionina pura. Químicamente, la D,L-metionina se produce comúnmente a partir de acroleína, metil mercaptano y cianuro de hidrógeno. No obstante, la mezcla racémica no se desempeña también como la L-metionina pura, como por ejemplo en aditivos de pienso de pollo (Saunderson, C.L., (1985) British Journal of Nutrition 54, 621-633). La L-metionina pura puede producirse a partir de metionina racémica, p. ej., a través del
20 tratamiento de acilasa de N-acetil-D,L-metionina, que aumenta drásticamente los costes de producción. La demanda cada vez mayor de L-metionina pura, sumada a las preocupaciones medioambientales, hace que la producción microbiana de metionina sea atractiva.

- 25 Se conoce también la técnica anterior del uso de la bioproducción fermentativa de metionina cultivando un microorganismo modificado para producir metionina. El documento WO 03/087386 se refiere a métodos para producir sustancias químicas sulfurosas finas, en particular L-metionina, por fermentación, usando bacterias, en donde se expresa una secuencia de nucleótidos que codifica un gen meth de metionina sintetasa.

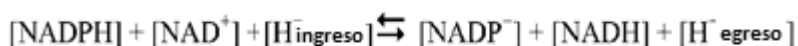
- 30 Los pares de cofactores NADPH/NADP⁺ y NADH/NAD⁺ son esenciales para todos los organismos vivos. Son donantes y/o aceptores para reducir equivalentes en muchas reacciones de oxidación-reducción en células vivientes. Si bien químicamente muy similares, los cofactores de reducción y oxidación NADH y NADPH cumplen funciones bioquímicas distintas y participan en más de 100 reacciones enzimáticas (Ouzonis, C. A. y, P. D. (2000) Genome Res. 10, 568-576). Las reacciones catabólicas normalmente se vinculan a NAD⁺/NADH, y las reacciones anabólicas normalmente se vinculan a NADP⁺/NADPH. Juntos, estos nucleótidos tienen un impacto directo sobre prácticamente cada vía metabólica de oxidación-reducción.

- 35 Muchos compuestos industrialmente útiles requieren el cofactor NADPH para su biosíntesis, como por ejemplo: la producción de etanol en xilosa en levadura (Verho et al., (2003) Applied and Environmental Microbiology 69, 5892-5897), la producción de alto rendimiento de (+)-catequinas (Chemler et al., (2007) Applied and Environmental Microbiology 77, 797-807), la biosíntesis en licopeno en *E.coli* (Alper, H. et al., (2005) Metab. Eng. 7, 155-164) o la producción de lisina en *Corynebacterium glutamicum* (Kelle T et al., (2005) L-lysine production; en: Eggeling L, Bott M (eds) Handbook of corynebacterium glutamicum. CRC, Boca Raton, pág 467-490).

- 40 La producción biotecnológica de L-metionina con *Escherichia coli* requiere un grupo suficiente de NADPH. La metionina deriva del aminoácido aspartato, pero su síntesis requiere la convergencia de dos vías adicionales, biosíntesis de cisteína y metabolismo de C1 (N-metiltetrahidrofolato). El aspartato se convierte a homoserina por una secuencia de tres reacciones. La homoserina puede ingresar subsiguientemente en la vía biosintética de treonina /isoleucina o de metionina.

- 45 La producción de una molécula de L-metionina requiere 8,5 moles de NADPH. Para satisfacer el requerimiento de NADPH tanto para desarrollo de *E.coli* como para la producción de L-metionina en medio mínimo, los inventores proponen aquí aumentar la actividad de la transhidrogenasa, con el objetivo de aumentar la agrupación de NADPH en la célula.

- 50 La reacción de transhidrogenasa (a continuación) se puede catalizar o bien por una enzima unida a una membrana o una enzima de translocación unida a protones (PntAB) o una enzima de isoforma independiente de energía soluble (SthA).



E.coli posee dos transhidrogenasas de nicotinamida nucleótido codificadas por los genes *sthA* (también llamadas *udhA*) y *pntAB* (Sauer U. et al., 2004, JBC, 279:6613-6619). La función fisiológica de las transhidrogenasas PntAB y SthA en microorganismos es la generación y la re-oxidación de NADPH, respectivamente (Sauer U. et al., 2004, JBC, 279:6613-6619). La transhidrogenasa unida a membrana PntAB usa el gradiente de protones electroquímicos como fuerza impulsora para la reducción de NADP⁺ a NADPH por oxidación de NADH a NAD⁺ (Jackson JB, 2003, FEBS Lett 545:18-24).

Se han empleado varias estrategias para mejorar la disponibilidad de NADPH en células enteras. Moreira dos Santos et al. (2004) describen el uso de enzimas málicas dependientes de NADP⁺ para aumentar los niveles citosólicos de NADPH dentro de *Saccharomyces cerevisiae*. Weckbecker y Hummel (2004) describen la sobreexpresión de *pntAB* en *E.coli* para mejorar la conversión dependiente de NADPH de acetofenona a (R)-feniletanol. Sanchez et al. (2006) describen la sobreexpresión de la transhidrogenasa soluble SthA en *E. coli* para mejorar la producción dependiente de NADPH de poli (3-hidroxibutirato).

Los inventores han descubierto sorprendentemente que, al aumentar la actividad de PntAB y reducir la reacción catalizada por SthA en la bacteria, la producción de metionina aumenta significativamente.

A su vez, al combinar una alta actividad de transhidrogenasa y un incremento de la actividad de metilentetrahidrofolato reductasa (MetF), para desencadenar el metabolismo de un carbono en la célula, la producción de L-metionina por fermentación de los microorganismos modificados mejora en gran medida.

La presente descripción se refiere a un microorganismo que produce metionina, en donde aumenta su producción de NADPH. El incremento de la producción de NADPH se logra aumentando la actividad de la PntAB transhidrogenasa como una única modificación, o en combinación con la atenuación de la actividad de UdhA transhidrogenasa. En una realización particular de la invención, el incremento de la producción de NADPH se acopla con un incremento del metabolismo de un carbono.

La descripción se refiere también a un método para la producción de metionina, en un proceso fermentativo que comprende las etapas de:

- cultivar un microorganismo que produce metionina modificada en un cultivo adecuado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno, y
- recuperar metionina y/ sus derivados del medio de cultivo,

en donde en dicho microorganismo, la actividad de la transhidrogenasa de PntAB mejora en un modo en que aumenta la producción reducida de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH).

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un microorganismo modificado para la producción mejorada de metionina, en donde un microorganismo de la familia de *Enterobacteriaceae* optimizado para la producción de metionina se modifica para potenciar la actividad de la transhidrogenasa de PntAB por sobreexpresión de los genes que codifican PntAB.

Otro aspecto de la invención se refiere además a un método para la producción de metionina en un proceso fermentativo descrito en lo sucesivo.

Definiciones

La presente descripción se refiere a microorganismos que contienen modificaciones genéticas para potenciar la expresión de genes o la producción o actividad de proteínas.

En la descripción de la presente invención, los genes y las proteínas se identifican usando las denominaciones de los correspondientes genes en *E. coli*. No obstante, y a menos que se especifique otra cosa, el uso de estas denominaciones tiene un significado más general de acuerdo con la invención y abarca todos los genes y proteínas correspondientes en otros organismos, más particularmente microorganismos.

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

Los COG (racimos de grupos ortólogos de proteínas; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen comparando secuencias de proteínas de 66 genomas totalmente secuenciados que representan 38 líneas filogenéticas principales.

Cada COG se define a partir de por lo menos tres líneas, lo que permite la identificación de dominios conservados pasados.

Los expertos en la técnica conocen los medios para identificar secuencias homólogas y sus porcentajes de homología, e incluyen en particular los programas BLAST, que se pueden usar desde el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros por defecto indicados en ese sitio web. Las secuencias obtenidas pueden luego explotarse (p. ej., alinearse) usando, por ejemplo, los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) o MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), con los parámetros por defecto indicados en esos sitios web.

Usando las referencias expuestas en GenBank para genes conocidos, los expertos en la técnica pueden determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo de rutina se realiza ventajosamente usando secuencias de consenso que se pueden determinar llevando a cabo alineaciones de consenso con genes derivados de otros microorganismos, y diseñando sondas degeneradas para clonar el correspondiente gen en otro organismo. Estos métodos de rutina de biología molecular se conocen en la técnica, y se reivindican, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2a ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Nueva York.).

La expresión "atenuación de actividad" de acuerdo con la invención se podría emplear para una enzima o un gen y representa, en cada caso, la supresión parcial o completa de la expresión del correspondiente gen, que luego se dice que está 'atenuado'. Esta supresión de la expresión puede o bien ser una inhibición de la expresión del gen, una eliminación de toda o parte de la región promotora necesaria para la expresión del gen, una eliminación en la región codificante del gen, o el intercambio del promotor de tipo salvaje por un promotor natural o sintético más débil. Preferentemente, la atenuación de un gen es esencialmente la eliminación completa de ese gen, que puede reemplazarse por un gen marcador de selección que facilita la identificación, el aislamiento y la purificación de las cepas de acuerdo con la invención. Un gen es inactivado preferiblemente por la técnica de recombinación homóloga (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products". Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 97: 6640-6645).

La expresión "actividad de transhidrogenasa PntAB potenciada" designa una actividad enzimática que es superior a la actividad enzimática del microorganismo no modificado. El experto en la técnica sabe cómo medir la actividad enzimática de dicha enzima. En una realización preferida de la invención, la actividad de PntAB aumenta en 10% en comparación con la actividad observada en un microorganismo no modificado; preferiblemente, dicha actividad aumenta 20%, más preferiblemente 30%, incluso más preferiblemente 50% o más de 60%.

Para potenciar una actividad enzimática, el experto en la técnica conoce los diferentes medios: modificar el sitio catalítico de la proteína, aumentar la estabilidad de la proteína, aumentar la estabilidad del ARN mensajero, aumentar la expresión del gen que codifica la proteína.

Los elementos que estabilizan las proteínas se conocen en la técnica (por ejemplo, las etiquetas GST, Amersham Biosciences), así como también elementos que estabilizan el ARN mensajero (Carrier y Keasling (1998) Biotechnol. Prog. 15, 58-64).

Las expresiones "mayor expresión del gen", "expresión potenciada del gen" o "sobreexpresión del gen" se utilizan de manera intercambiable en el contexto y tienen significado similar.

Para aumentar la expresión de un gen, el experto en la técnica conoce las diferentes técnicas, aumentar el número de copias del gen en el microorganismo, usar un promotor que induce un alto nivel de expresión del gen, atenuar la actividad y/o la expresión de un represor de transcripción directo o indirecto del gen.

El gen es codificado en forma cromosómica o extracromosómica. Cuando el gen está ubicado en el cromosoma, se pueden introducir varias copias del gen en el cromosoma por métodos de recombinación conocidos por el experto en el campo (incluido el reemplazo del gen). Cuando el gen se localiza en forma extracromosómica, el gen es portado por distintos tipos de plásmidos que difieren con respecto al origen de la replicación y por lo tanto su número de copias en la célula. Estos plásmidos se presentan en el microorganismo en 1 a 5 copias, o aproximadamente 20 copias, o hasta 500 copias, dependiendo de la naturaleza del plásmido: plásmidos con bajo número de copias con replicación ajustada (pSC101, RK2), plásmidos con bajo número de copias (pACYC, pRSF1010) o plásmidos con alto número de copias (pSK bluescript II).

En una realización específica de la invención, el gen se expresa usando promotores con distinta fortaleza. En una realización de la invención, los promotores son inducibles. Estos promotores son homólogos o heterólogos. El experto en la técnica conoce cuáles son los promotores más convenientes, por ejemplo los promotores *P_{trc}*, *P_{tac}*, *P_{lac}* o el promotor lambda *cI* se utilizan ampliamente.

Derivados de metionina:

De acuerdo con la invención, la metionina se recupera del medio de cultivo. No obstante, es también posible recuperar del medio de cultivo algunos derivados de metionina, que pueden convertirse en metionina en una reacción simple. Los derivados de metionina derivan de vías que transforman y/o degradan la metionina tales como S-acil metionina y N-acil metionina. En particular, estos productos son S-adenosil-metionina (SAM) y N-acetil-metionina (NAM). Especialmente NAM es un derivado de metionina fácilmente recuperable que se puede aislar y transformar en metionina por desacilación.

Microorganismos

El término "microorganismo para la producción de metionina" o "microorganismo para la producción de metionina" designa un microorganismo que produce niveles más altos de metionina que los microorganismos que no producen metionina, que produce metionina solamente para sus necesidades endógenas. Los microorganismos "optimizados" para la producción de metionina se conocen en la técnica, y se han descrito en particular en las solicitudes de patentes WO2005/111202, WO2007/077041 y WO2009/043803.

La expresión "microorganismo modificado" se refiere a un microorganismo modificado para una producción de metionina mejorada. En particular, la cantidad de metionina producida por el microorganismo, y particularmente la producción de metionina (relación de metionina gramo/mol producida por gramo/mol de la fuente de carbono), es superior en el microorganismo modificado en comparación con el correspondiente microorganismo no modificado. Las modificaciones usuales incluyen eliminaciones de genes por transformación y recombinación, reemplazo de genes e introducción de vectores para la expresión de genes heterólogos.

El microorganismo utilizado en la descripción es una bacteria, una levadura o un hongo. Preferiblemente, el microorganismo se selecciona entre *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae* and *Corynebacteriaceae*. En un aspecto de la invención, el microorganismo es una bacteria seleccionada entre *Enterobacteriaceae*. Más preferiblemente, el microorganismo del género *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Salmonella* o *Corynebacterium*. En una realización preferida de la invención, el microorganismo es del género *Escherichia*. Incluso más preferiblemente, el microorganismo es o bien de la especie *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum*.

Aumento de NADPH

De acuerdo con la descripción, el microorganismo modificado comprende, por un lado, las modificaciones para una mejor producción de metionina y, por el otro, las modificaciones para una mejor producción de NADPH disponible, aumentando la actividad de transhidrogenasa de PntAB.

PntAB es una transmembrana piridina nucleótido transhidrogenasa que cataliza la reducción de NADP^+ en NADPH mediante oxidación de NADH en NAD^+ , y que está compuesto por dos subunidades alfa y beta codificadas respectivamente por los genes *pntA* y *pntB*.

El aumento de la actividad de PntAB mejora la producción de NADPH disponible en la célula. Esto no conduce automáticamente a un mayor aumento de la concentración en la célula, ya que la NADPH disponible puede ser consumida directamente por las enzimas dependientes de NADPH. La expresión "aumento de la actividad de PntAB" en este contexto describe el incremento en la actividad intracelular de la transhidrogenasa que es codificada por los correspondientes genes *pntA* y *pntB*, por ejemplo aumentando el número de copias del gen, usando un promotor más fuerte o usando un alelo con mayor actividad y posiblemente combinando estos medios.

En un aspecto de la invención, los genes que codifican pntAB están sobreexpresados.

En una realización particular de la invención, los genes *pntAB* se sobreexpresan usando promotores que exhiben alta fuerza. Dichos promotores son, por ejemplo aquellos pertenecientes a la familia *P_{trc}* que exhibe una fuerza específica. El promotor *P_{trc}* es un promotor híbrido artificial que exhibe secuencias de consenso del promotor de *E. coli* típico, *Plac* y *P_{trp}*, particularmente en las -35 casillas de *Plac* y las -10 casillas de *P_{trp}* (Amann et al, 1983, Gene and Amann et al, 1988, Gene). Los inventores modificaron este promotor artificial modificando las secuencias de consenso de -10 o -35 casillas de acuerdo con la comparación de promotores en el estudio de Hawley (Hawley & McClure, 1983, Nucleic Acids Research) para obtener series de promotores con diferentes fuerzas. Cuanto más distintas sean las secuencias del consenso -10 y -35 casillas; menor será la fuerza del promotor. Los promotores *P_{trc}* utilizados en la descripción se denominan *P_{trc}* ponderados por un número: cuanto más alto sea el número, mayor será la diferencia entre la secuencia del promotor artificial y la secuencia de consenso.

En una realización específica de la invención, el incremento de NADPH disponible se obtiene aumentando la actividad de PntAB en combinación con una atenuación de la actividad de UdhA. UdhA es una piridina nucleótido transhidrogenasa soluble que cataliza esencialmente la oxidación de NADPH en NADP^+ mediante la reducción de NAD^+ en NADH.

Como se describió anteriormente, la atenuación de la actividad de UdhA se puede lograr suprimiendo parcial o completamente el correspondiente gen de *udhA*, inhibiendo la expresión del gen *udhA*, eliminando todo o parte de la

región del promotor necesaria para la expresión del gen, mediante una eliminación en la región codificante del gen o por intercambio del promotor de tipo salvaje por un promotor más débil, natural o sintético.

En una realización preferida de la invención, la atenuación de la actividad de UdhA se logra por eliminación completa del gen *udhA* por recombinación homóloga.

5 Metabolismo C1

En una realización preferida de la invención, el aumento de la producción de NADPH se une al incremento del metabolismo de un carbono (dicho metabolismo C1) en el microorganismo productor de metionina. El experto en la técnica conoce el metabolismo de C1 que se basa en la metabolización de folato. El folato es reducido a dihidrofolato por la folato reductasa y luego a tetrahidrofolato (dicho THF) por dihidrofolato reductasa. THF es un compuesto implicado en la biosíntesis de ADN base y aminoácidos.

THF acepta un grupo metileno que se origina de glicina o serina y forma metileno-THF. En el caso de serina, la transferencia del grupo metileno a THF es catalizada por serina hidroximetiltransferasa (GlyA) o en el caso de glicina por el complejo de escisión de glicina (GcvTHP). El complejo de escisión de glicina (GCV) es un complejo multienzimático que cataliza la oxidación de glicina, produciendo dióxido de carbono, amoníaco, metileno-THF y disminución de piridina nucleótido. El complejo GCV consiste en cuatro componentes de proteínas, la proteína P mencionada de glicina deshidrogenasa (GcvP), la proteína H mencionada de proteína lipoil-GcvH (GcvH), la proteína T mencionada de aminometiltransferasa (GcvT) y la proteína L de dihidrolipoamida deshidrogenasa (GcvL o Lpd). La proteína P cataliza la liberación dependiente de fosfato piridoxal de CO₂ de glicina, dejando un resto metilamina. El resto metilamina se transfiere al grupo ácido lipoico de la proteína H, que se une a la proteína P antes de la descarboxilación de glicina. La proteína T cataliza la liberación de NH₃ del grupo metilamina y transfiere la restante unidad C1 a THF, formando metileno-THF. La proteína L luego oxida el componente de ácido lipoico de la proteína H y transfiere los electrones a NAD⁺, formando NADH.

En la biosíntesis de metionina, se puede reducir metileno-THF por metileno tetrahidrofolato reductasa (MetF) para formar metil-THF. Metil-THF es el donante de metilo durante la metilación de homocisteína por las metiltransferasas MetE o MetH para formar metionina.

Aumentar el metabolismo de C1 produce una mejor producción de metionina

De acuerdo con la invención, "aumentar el metabolismo de C1" se refiere a aumentar la actividad de por lo menos una enzima implicada en el metabolismo de C1 elegida entre MetF, GcvTHP, Lpd, GlyA; MetE o MetH. Para aumentar la actividad de la enzima, los correspondientes genes de estas enzimas diferentes pueden sobreexpresarse o modificarse en su secuencia nucleica a la enzima expresada con mejor actividad o se puede reducir su sensibilidad a la regulación de la retroalimentación.

En una realización preferida de la invención, el metabolismo de un carbono se incrementa aumentando la actividad de la metilnotetrahidrofolato reductasa MetF y/o la actividad del complejo de escisión de glicina GcvTHP y/o la actividad de la serina hidroximetiltransferasa GlyA.

En una realización específica de la invención, la actividad de MetF mejora con la sobreexpresión del gen *metF* y/u optimizando la traducción.

En una realización específica de la invención, la sobreexpresión del gen *metF* se logra expresando el gen bajo el control de un promotor fuerte perteneciente a los promotores de la familia *P_{trc}*, o bajo el control de un promotor inducible, como un promotor inducible de temperatura P_R como se describe en la solicitud PCT/FR2009/052520.

De acuerdo con otra realización de la descripción, la optimización de la traducción de la proteína MetF se obtiene usando un estabilizador de ARN. El experto en el campo conoce otros medios para la sobreexpresión de un gen, y se pueden usar para la sobreexpresión del gen *metF*.

En una realización preferida de la invención, el microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae* optimizado para la producción de metionina se modifica para mejorar la actividad de transhidrogenasa de PntAB por sobreexpresión de los genes que codifican PntAB y para aumentar el metabolismo de un carbono mejorando por lo menos una de las siguientes actividades:

a. la actividad de metilnotetrahidrofolato reductasa, MetF por sobreexpresión del gen *metF* y/u optimización de su traducción expresando el gen *metF* bajo el control del promotor fuerte perteneciente a los promotores de la familia *P_{trc}*

b. la actividad del complejo de escisión de glicina, GcvTHP y Lpd sobreexpresando el gen *gcvTHP* y el gen *lpd*

c. la actividad de serina hidroximetiltransferasa, GlyA sobreexpresando la actividad del gen *glyA* de metiltransferasa, MetH o MetE sobreexpresando el gen *metH* o *metE*.

En otra realización preferida de la invención, el microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae* optimizado para la producción de metionina se modifica para mejorar la actividad de la transhidrogenasa de PntAB por sobreexpresión de los genes que codifican PntAB, para atenuar la actividad de transhidrogenasa UdhA eliminando el gen que codifica UdhA y para incrementar el metabolismo de un carbono potenciando por lo menos una de las siguientes actividades:

a. la actividad de metilentetrahidrofolato reductasa, MetF sobreexpresando el gen *metF* y/u optimizando su traducción al sobreexpresar el gen *metF* bajo el control del promotor fuerte que pertenece a los promotores de la familia *Ptrc*.

b. la actividad del complejo de escisión de glicina, GcvTHP y Lpd sobreexpresando el gen *gcvTHP* y el gen *lpd*

c. la actividad de serina hidroximetiltransferasa, GlyA sobreexpresando el gen *glyA*

d. la actividad de metiltransferasa, MetH o MetE sobreexpresando el gen *metH* o *metE*.

Optimización de la vía de biosíntesis de metionina:

Como se indicó anteriormente, el microorganismo modificado utilizado en la presente invención puede comprender otras modificaciones en la producción de NADPH disponible y del metabolismo C1, modificaciones para una mejor producción de metionina.

Los genes implicados en la producción de metionina en un microorganismo se conocen en la técnica, y comprenden genes implicados en la vía de biosíntesis específica de metionina además de genes implicados en las vías que proporcionan los precursores y genes implicados en las vías de consumo de metionina.

La producción eficiente de metionina requiere la optimización de la vía específica de metionina y varias vías que proporcionan los precursores. Las cepas que producen metionina se han descrito en las solicitudes de patente WO2005/111202, WO2007/077041 y WO2009/043803.

La solicitud de patente WO2005/111202 describe una cepa productora de metionina que sobreexpresa alelos de homoserina succiniltransferasa con sensibilidad de retroalimentación reducida a sus inhibidores SAM y metionina. Esta solicitud describe también la combinación de estos alelos con una eliminación del represor de metionina MetJ responsable de la reducción del regulón de metionina. Además, la solicitud describe combinaciones de las dos modificaciones con la sobreexpresión de aspartocinasa/homoserina deshidrogenasa.

Para mejorar la producción de metionina, el microorganismo puede exhibir:

- una mayor expresión de por lo menos un gen seleccionado del grupo que consiste en:
- *cysU* que codifica un componente del transportador de sulfato ABC, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- *cysW* que codifica una proteína de transporte de sulfato unida a una membrana, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- *cysA* que codifica una sulfato permeasa, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- *cysM* que codifica una O-acetil serina sulhidralasa, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- *cysI* and *cysJ* que codifican respectivamente las subunidades alfa y beta de una sulfito reductasa descrita en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803. Preferiblemente *cysI* y *cysJ* se sobreexpresan juntos,
- *cysH* que codifica una adenilsulfato reductasa, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- *cysE* que codifica una serina aciltransferasa, como se describe en el documento WO2007/077041,

- *serA* que codifica una fosfoglicerato deshidrogenasa, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- *serB* que codifica una fosfoserina fosfatasa, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- 5 • *serC* que codifica una fosfoserina aminotransferasa, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- alelos de *metA* que codifican una homoserina succinoltransferasa con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina como se describe en el documento WO2005/111202,
- 10 • alelos de *thrA* o *thrA* que codifican aspartocinasas/homoserina deshidrogenasa con inhibición de retroalimentación reducida a treonina, como se describe en el documento WO2009/043803 y en el documento WO2005/111202,
- o una inhibición de la expresión de por lo menos uno de los siguientes genes:
- *pykA* que codifica una piruvato cinasa, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- 15 • *pykF* que codifica una piruvato cinasa, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- *purU* que codifica una formiltetrahydrofolato desformilasa, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803.
- 20 • *yncA* que codifica una N-acetiltransferasa, como se describe en el documento WO 2010/020681
- *metJ* que codifica un represor de la vía de biosíntesis de metionina, como se describe en el documento WO2005/111202.

25 En una realización específica de la invención, los genes pueden estar bajo el control de un promotor inducible. La solicitud de patente PCT/FR2009/052520 describe una cepa que produce metionina que expresa el alelo *thrA* con inhibición de la retroalimentación reducida a treonina y *cysE* bajo el control de un promotor inducible. En particular, el gen o el alelo *thrA* está bajo el control de un promotor inducible de temperatura. En una realización más preferida, el promotor inducible de temperatura utilizado pertenece a la familia de promotores P_R.

30 En una realización preferida de la invención, se potencia la actividad de la piruvato carboxilasa. Aumentar la actividad de la piruvato carboxilasa se obtiene sobreexpresando el correspondiente gen o modificando la secuencia nucleica de este gen para expresar una enzima con actividad mejorada. En particular, el gen *pyc* se introduce en el cromosoma en una o varias copias por recombinación o es portado por un plásmido presente en por lo menos una copia en el microorganismo modificado. El gen *pyc* se origina de las especies *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Lactococcus lactis* o *Corynebacterium*. En particular, los genes sobreexpresados están en su posición nativa en el cromosoma, o se integran en una posición no nativa. Para una producción de metionina

35 óptima, se pueden requerir varias copias del gen, y estas múltiples copias se integran en locus específicos, cuya modificación no tiene un impacto negativo en la producción de metionina.

Los ejemplos para locus en los que se puede integrar un gen, sin alterar el metabolismo de la célula, son:

Locus	número de acceso	de función
aaaD	87081759	Pseudogén, homólogo de fago terminasa proteína A, fragmento N-terminal
aaaE	1787395	Pseudogén homólogo de fago terminasa proteína A, fragmento C-terminal
afuB	1786458	Pseudogén permeasa del transportador de la familia ABC férrica; fragmento C-terminal
afuC	87081709	pronosticó la subunidad del transportador ABC férrico (componente de unión a ATP)

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
agaA	48994927	Pseudogén, fragmento C-terminal, GalNAc-6-P desacetilasa
agaW	1789522	Pseudogén, fragmento N-terminal, sistema PTS EIICGalNAc
alpA	1788977	proteasa
appY	1786776	activador de transcripción de unión al ADN
argF	1786469	ornitina carbamoiltransferasa
argU	ninguno	arginina ARNt
argW	ninguno	Arginina ARNt (CCU) 5
arpB	87081959	Reconstrucción del pseudogén, repeticiones de anquirina
arrD	1786768	lisozoma
arrQ	1787836	Homólogo de la proteína R del lisozoma del fago lambda
arsB	87082277	transportador de arsenita
arsC	1789918	arsenato reductasa
arsR	1789916	represor de transcripción de unión al ADN
beeE	1787397	Pseudogén, fragmento N-terminal, proteína portal
borD	1786770	homólogo de la proteína bacteriófago lambda Bor
cohE	1787391	Represor tipo CI
croE	87081841	Represor tipo Cro
cspB	1787839	Proteína de choque frío
cspF	1787840	Homólogo de la proteína de choque frío
cspl	1787834	Proteína de choque frío
cybC	1790684	Pseudogén, fragmento N-terminal, citocromo b562
dicA	1787853	Regulador de dicB
dicB	1787857	Control de la división celular
dicC	1787852	Regulador de dicB
dicF	ninguno	DicF ARN antisentido

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
eeH	1786488	Pseudogén, homólogo de intimin
efeU	87081821	Reconstrucción del pseudogén, permeasa de hierro ferrosa
emrE	1786755	bomba resistente a múltiples fármacos
essD	1786767	proteína de lisis de fagos pronosticada
essQ	87081934	Homólogo de la proteína de lisis del fago lambda S
exoD	1786750	Pseudogén, fragmento de exonucleasa C-terminal
eyeA	ninguno	ARNs nuevo, función desconocida
flu	48994897	Anígeno 43
flxA	1787849	Desconocida
gapC	87081902	Reconstrucción del pseudogén, GAP deshidrogenasa
gatR	87082039	Reconstrucción del pseudogén, represor del 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 unida a bactoprenol
gtrB	1788692	Bactoprenol glucosil transferasa
gtrS	1788693	glucosil transferasa
hokD	1787845	Polipéptido tóxico de membrana pequeña
icd	1787381	Isocitrato deshidrogenasa
icdC	87081844	Pseudogén
ilvG	87082328	Reconstrucción del pseudogén, ácido acetohidroxi sintasa II
insA	1786204	ge IS1, función de transposición
insA	1786204	gen IS1, función de transposición
insB	1786203	transposasa de secuencia de inserción IS1
insB	1786203	transposasa de secuencia de inserción IS1

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
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	gen IS30, 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, transposasa de la familia IS3, fragmento N-terminal
insZ	1787491	Reconstrucción del pseudogén, familia de IS4 transposasa, en ISZ'
intA	1788974	Gen de integrasa
intB	1790722	Reconstrucción del pseudogén, integrasa de tipo P4
intD	1786748	integrasa pronosticada
intE	1787386	e14 integrasa
intF	2367104	fago integrasa pronosticada
intG	1788246	Pseudogén, homólogo de integrasa
intK	1787850	Pseudogén, fragmento de integrasa
intQ	1787861	Pseudogén, fragmento de integrasa
intR	1787607	Gen de integrasa

Locus	número de acceso	función
intS	1788690	Integrasa
intZ	1788783	Gen putativo de integrasa
isrC	ninguno	Nuevo ARNs, función desconocida
jayE	87081842	Pseudogén, fragmento C-terminal, placa base
kilR	87081884	Función de inactivación del profago Rac
lafU	ninguno	Pseudogén, fragmento de proteína motora flagelar lateral
1fhA	87081703	Pseudogén, fragmento de la proteína de ensamblaje flagelar lateral
lit	1787385	Peptidasa de muerte celular
		Reconstrucción del pseudogén, homólogo de lom; membrana externa
lomR	1787632	proteína interrumpida por IS5Y, término N ausente
malS	1789995	α -amilasa
mcrA	1787406	proteína de unión a AND específica de 5-metilcitosina
mdtQ	87082057	Reconstrucción del pseudogén, familia OMF de la bomba del fármaco de lipoproteína
melB	1790561	melibiosa permeasa
mmuM	1786456	homocisteína metiltransferasa
mmuP	870811708	S-metilmetionina permeasa
mokA	ninguno	Pseudogén, péptido regulador de superposición, permite hokB
ninE	1786760	desconocida
nmpC	1786765	Reconstrucción del pseudogén, OM porina, interrumpida por IS5B
nohD	1786773	Proteína de empaque de AND
nohQ	1787830	Pseudogén, homólogo del fago lambda Nul, familia de la pequeña subunidad terminasa , proteína de empaque putativa
ogrK	1788398	Regulador positivo del crecimiento de P2
ompT	1786777	proteasa de la membrana externa VII
oweE	ninguno	Pseudogén, homólogo O de la proteína de replicación lambda

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
oweS	1788700	Pseudogén, homólogo O de la proteína de replicación lambda
pauD	ninguno	pseudogén argU, sitio de sujeción del profago DLP12
pawZ	ninguno	sitio de sujeción del profago CPS-53 attR, pseudogén argW
pbl	87082169	Reconstrucción del pseudogén, homólogo de pilT
peaD	87081754	Pseudogén, familia P de proteína de replicación fago lambda; fragmento C-terminal
perR	1786448	porin de membrana exterior del regulador de transcripción de unión a ADN de poli-β-1,6-N-acetil-D-glucosamina
pgaA	1787261	vía de biosíntesis (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 pronosticada
phnE	87082370	Reconstrucción del pseudogén, fosfonato permeasa
pinE	1787404	ADN invertasa
pinH	1789002	Pseudogén, ADN invertasa, recombinación específica del sito
pinQ	1787827	ADN invertasa
pinR	1787638	ADN invertasa
prfH	1786431	Pseudogén, homólogo del factor de liberación de proteínas
psaA	ninguno	pseudogén ssrA, duplicación del sitio de sujeción de CP4-57
ptwF	ninguno	pseudogén thrW, sitio de sujeción del profago CP4-6
quuD	1786763	proteína de antiterminación pronosticada
quuQ	87081935	Homólogo de la proteína de antiterminación de lambda Q
racC	1787614	Desconocido
racR	1787619	Supresor del profago de Rac, de tipo cl
ralR	1787610	Gen de alivio de restricción
rbsA	1790190	Subunidad del transportador de D-ribosa ABC (componente de unión a ATP)

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
rbsD	87082327	D-ribosa piranasa
recE	1787612	RecET recombinasa
recT	1787611	RecET recombinasa
relB	1787847	Antitoxina para RelE
relE	1787846	ARN endorribonucleasa específica de secuencias
rem	1787844	desconocido
renD	87081755	Reconstrucción del pseudogén, homólogo de lambda ren, ininterrumpido por IS3C; activador putativo de transcripción de lit
rhsE	1787728	Pseudogén, familia rhs, codificado dentro de la repetición de RhsE
rnlA	1788983	RNase LS, endorribonucleasa
rph	1790074	Reconstrucción del pseudogén, RNase PH
rusA	1786762	Endonucleasa
rzoD	87081757	Lipoproteína de tipo Rz1 probable
rzoQ	ninguno	Lipoproteína de tipo Rz1 probable
rzoR	87081890	Lipoproteína de tipo Rz1 probable
rzpD	1786769	Mureína endopeptidasa pronosticada
rzpQ	1787835	equivalente de tipo Rz
rzpR	87081889	Pseudogén, homólogo de Rz
sieB	87081885	Proteína de exclusión de superinfecciones
sokA	ninguno	Pseudogén, traducción de ARNs antisentido bloqueante de mokA/hokA
stfE	87081843	Cassette variable de Stf C-terminal, proteína de especificidad virión-hospedante alternativa; dominio Tail Collar, pseudogén
stfP	1787400	Proteína de la fibra terminal pronosticada
stfR	87081892	Proteína de la fibra terminal lateral
tfaD	87081759	Pseudogén, gen de ensamblaje de la fibra terminal, fragmento C
tfaE	1787402	Gen de ensamblaje de la fibra terminal pronosticada

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
tfaP	1787401	Gen de ensamblaje de la fibra terminal pronosticada
tfaQ	2367120	Homólogo del gen de ensamblaje de la fibra terminal del fago lambda
tfaR	1787637	Homólogo del gen de ensamblaje de la fibra terminal del fago lambda
tfaS	87082088	Pseudogén, gen de ensamblaje de la fibra terminal, fragmento C-terminal
tfaX	2367110	Reconstrucción del pseudogén, gen de ensamblaje de la fibra terminal, fragmento C-terminal
thrW	ninguno	treonina ARNt (sitio de sujeción del profago CP4-6)
torI	87082092	CPS-53/KpLE1 excisionasa
treB	2367362	subunidad de trehalosa PTS permeasa (dominios IIB/IIC)
treC	1790687	trehalosa-6-fosfato hidrolasa
trkG	1787626	Permeasa de absorción de K ⁺ constitutiva principal
ttcA	1787607	Gen de integrasa
ttcC	ninguno	Pseudogén, duplicación de ttcA del sitio de integración del profago Rac
uidB	1787902	Glucurónido permeasa, mutante puntual inactivo
uxaA	1789475	altronato hidrolasa
uxaC	2367192	uronato isomerasa
wbbL	1788343	Reconstrucción de pseudogén, rhamnosil transferasa
wcaM	1788356	proteína de biosíntesis de ácido colánico pronosticada
		Pseudogén, fragmento de excisionasa en profago defectuoso
xisD	ninguno	DLP12
xisE	1787387	e14 excisionasa
yabP	1786242	Reconstrucción del pseudogén
yafF	87081701	Pseudogén, fragmento C-terminal, proteína asociada a la repetición de H
yafU	1786411	Pseudogén, fragmento C-terminal
yafW	1786440	antitoxina del sistema Ykfl-YafW toxina-antitoxina

Locus	número de acceso	función
yafX	1786442	desconocido
yafY	1786445	regulador de transcripción de unión al ADN pronosticado, lipoproteína de membrana interna
yafZ	87081705	desconocido
yagA	1786462	regulador de transcripción de unión al ADN pronosticado
yagB	87081711	Pseudogén, fragmento N-terminal relacionado a la antitoxina
yagE	1786463	liasa/sintasa pronosticada
yagF	1786464	deshidratasa pronosticada
yagG	1786466	symporter de azúcar putativo
yagH	1786467	β -xilosidasa putativa
yagI	1786468	regulador de transcripción de unión al ADN pronosticado
yagJ	1786472	desconocido
yagK	1786473	desconocido
yagL	1786474	proteína de unión al ADN
yagM	2367101	desconocido
yagN	2367102	desconocido
yagP	1786476	Pseudogén, familia LysR, fragmento
yaiT	1786569	Reconstrucción del pseudogén, familia del autotransportador
yaiX	87082443	Reconstrucción del pseudogén, interrumpido por IS2A
ybbD	1786709	Reconstrucción del pseudogén, familia conservada nueva
ybcK	1786756	recombinasa pronosticada
ybcL	1786757	inhibidor de cinasa pronosticada
ybcM	1786758	regulador de transcripción de unión al ADN pronosticada
ybcN	1786759	proteína de rotación de base de ADN
ybcO	1786761	desconocido

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
ybcV	87081758	desconocido
ybcW	1786772	desconocido
ybcY	48994878	Reconstrucción del pseudogén, familia metiltransferasa
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 del núcleo Rhs con extensión única
ycgH	87081847	Reconstrucción del pseudogén
ycgI	1787421	Reconstrucción del pseudogén, homólogo del autotransportador
ycjV	1787577	Reconstrucción del pseudogén, parálogo malk
ydaC	1787609	desconocido
ydaE	87081883	Metalotioneína
ydaF	87081886	desconocido
ydaG	87081887	desconocido
ydaQ	87081882	Excisionasa putativa
ydaS	1787620	desconocido
ydaT	1787621	desconocido
ydaU	1787622	desconocido
ydaV	1787623	desconocido
ydaW	87081888	Pseudogén, fragmento N-terminal
ydaY	1787629	pseudogén
ydbA	87081898	Reconstrucción del pseudogén, homólogo del autotransportador
yddK	1787745	Pseudogén, fragmento C, rico en leucina
yddL	1787746	Pseudogén, familia de porin OmpCFN, fragmento N-terminal

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
ydeT	1787782	Pseudogén, familia FimD, fragmento C
ydfA	1787854	desconocido
ydfB	87081937	desconocido
ydfC	1787856	desconocido
ydfD	1787858	desconocido
ydfE	1787859	Pseudogén, fragmento N-terminal
ydfJ	1787824	Reconstrucción del pseudogén, familia MFS
ydfK	1787826	Gen de choque frío
ydfO	87081931	desconocido
ydfR	1787837	desconocido
ydfU	87081936	desconocido
ydfV	1787848	desconocido
ydfX	1787851	pseudogén
yedN	87082002	Reconstrucción del pseudogén, familia lpaH/YopM
yedS	87082009	Reconstrucción del pseudogén, homólogo de la proteína de membrana externa
yeeH	ninguno	Pseudogén, fragmento interno
yeeL	87082016	Reconstrucción del pseudogén, familia de glicosiltransferasa
yeeP	87082019	Pseudogén, proteína de unión a GTP putativa
yeeR	87082020	desconocido
yeeS	1788312	desconocido
yeeT	1788313	desconocido
		Componente antitoxina del par de proteínas antitoxina YeeV-
yeeU	1788314	YeeU
yeeV	1788315	Componente toxina del par de proteínas toxina-antitoxina YeeV-YeeU
yeeW	1788316	pseudogén

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
yegZ	ninguno	Pseudogén, proteína tipo fago P2 gpD D; fragmento C-terminal
yehH	87082046	Reconstrucción del pseudogén
yehQ	87082050	Reconstrucción del pseudogén
yejO	1788516	Reconstrucción del pseudogén, homólogo del autotransportador
yfaH	1788571	Reconstrucción del pseudogén, homólogo del fragmento C-terminal, LysR
yfaS	87082066	Reconstrucción del pseudogén
yfcU	1788678	Reconstrucción del pseudogén, familia FimD
yfdK	1788696	desconocido
yfdL	1788697	Pseudogén, proteína de la fibra terminal
yfdM	87082089	Pseudogén, gen intacto que codifica una AND adenina metiltransferasa pronosticada
yfdN	1788699	desconocido
yfdP	1788701	desconocido
yfdQ	1788702	desconocido
yfdR	87082090	desconocido
yfdS	1788704	desconocido
yfdT	1788705	desconocido
yffL	1788784	desconocido
yffM	1788785	desconocido
yffN	1788786	desconocido
yffO	1788787	desconocido
yffP	1788788	desconocido
yffQ	1788790	desconocido
yffR	1788791	desconocido
yffS	1788792	desconocido

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
yfjH	1788976	desconocido
yfjI	1788978	desconocido
yfjJ	1788979	desconocido
yfjK	1788980	desconocido
yfjL	1788981	desconocido
yfjM	1788982	desconocido
yfjO	87082140	desconocido
yfjP	48994902	desconocido
yfjQ	1788987	desconocido
yfjR	1788988	desconocido
yfjS	87082142	desconocido
yfjT	1788990	desconocido
yfjU	1788991	pseudogén
yfjV	1788992	Reconstrucción del pseudogén, fragmento C-terminal de tipo arsB
yfjW	2367146	desconocido
yfjX	1788996	desconocido
yfjY	1788997	desconocido
yfjZ	1788998	Componente antitoxina de toxina putativa-antitoxina YpjF-YfjZ
ygaQ	1789007	Reconstrucción del pseudogén, dominio relacionado con has alfa-amilasa
ygaY	1789035	Reconstrucción del pseudogén, familia MFS
ygeF	2367169	Reconstrucción del pseudogén, parte de T3SS PAI ETT2 remante
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

ES 2 637 280 T3

Locus	número de acceso	función
ygeQ	1789226	Reconstrucción del pseudogén, parte de T3SS PAI ETT2 remanente
yghE	1789340	Reconstrucción del pseudogén, familia de la proteína 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, interrumpido por IS5R
yhdW	1789668	Reconstrucción del pseudogén
yhiL	87082275	Reconstrucción del pseudogén, regulado por FliA
yhiS	1789920	Reconstrucción del pseudogén, interrumpido por IS5T
yhjQ	1789955	Reconstrucción del pseudogén
yibJ	48994952	Reconstrucción del pseudogén, familia de Rhs
yibS	ninguno	Reconstrucción del pseudogén, familia de Rhs, fragmento C-terminal
yibU	ninguno	Reconstrucción del pseudogén, proteína asociada a la repetición H
yibW	ninguno	Reconstrucción del pseudogén, unido a rhsA
yicT	ninguno	Pseudogén, fragmento N-terminal
yifN	2367279	Reconstrucción del pseudogén
yjbl	1790471	Reconstrucción del pseudogén
yjdQ	ninguno	Reconstrucción del pseudogén, integrasa de tipo P4 remanente
yjgX	1790726	Reconstrucción del pseudogén, familia de 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 del dedo de zinc
yjhZ	ninguno	Reconstrucción del pseudogén, parálogo de rimK, fragmento C-terminal

Locus	número de acceso	función
yjiP	1790795	Reconstrucción del pseudogén, familia de transposasa
yjiT	87082428	Pseudogén, fragmento N-terminal
yjiV	ninguno	Reconstrucción del pseudogén, fragmento C-terminal de tipo helicasa
yjiN	87082432	oxidorreductasa pronosticada
ykfA	87081706	proteína de unión a GTP putativa
ykfB	1786444	desconocido
ykfC	87081707	Pseudogén, familia de transcriptasa inversa de tipo retrón, fragmento N-terminal
ykfF	1786443	desconocido
ykfG	2367100	desconocido
ykfH	87081704	desconocido
ykfI	1786439	toxina del sistema toxina-antitoxina YkfI-YafW
ykfJ	1786430	Pseudogén, fragmento N-terminal
ykfK	1786445	Pseudogén, fragmento N-terminal
ykfL	ninguno	Pseudogén, fragmento C-terminal
ykfN	ninguno	Pseudogén, remanente N-terminal, familia YdiA
ykgA	87081714	Pseudogén, fragmento N-terminal, familia AraC
ykgP	ninguno	Pseudogén, fragmento oxidorreductasa
ykgQ	ninguno	Pseudogén, fragmento C-terminal de una deshidrogenasa putativa
ykgS	ninguno	Fragmento interno del 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 del núcleo Rhs con extensión única
yibI	ninguno	Pseudogén, fragmento interno, familia Rhs
ylcG	87081756	desconocido

Locus	número de acceso	función
ylcH	ninguno	desconocido
ylcI	ninguno	desconocido
ymdE	87081823	Pseudogén, fragmento C-terminal
ymfD	1787383	Metiltransferasa dependiente de SAM putativa
ymfE	1787384	desconocido
ymfI	87081839	desconocido
ymfJ	87081840	desconocido
ymfL	1787393	desconocido
ymfM	1787394	desconocido
ymfQ	1787399	Placa base o proteína de la fibra terminal putativa tt
ymfR	1787396	desconocido
ymjC	ninguno	Pseudogén, fragmento N-terminal
ymjD	ninguno	Proteína remanente de fusión al pseudogén de eliminación expresado
ynaA	1787631	Pseudogén, fragmento N-terminal
ynaE	1787639	Gen de choque frío
ynaK	1787628	desconocido
yncl	1787731	Reconstrucción del pseudogén, asociado a la repetición H, unido 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, adhesión del autotransportador OM putativo
ynfN	87081933	Gen de choque frío
ynfO	ninguno	desconocido
yoeA	87082018	Reconstrucción del pseudogén, interrumpido por IS2F
yoeD	ninguno	Pseudogén, fragmento C-terminal de una transposasa putativa
yoeF	87082021	Pseudogén, fragmento C-terminal

Locus	número de acceso	función
yoeG	ninguno	pseudogén, fragmento N-terminal
yoeH	ninguno	pseudogén, fragmento C-terminal
ypdJ	87082091	Pseudogén, fragmento de excisionasa
ypjC	1789003	Reconstrucción del pseudogén
ypjF	1788999	Componente de toxina del par toxina putativa-antitoxina YpjF-YfjZ
ypjI	ninguno	Reconstrucción del pseudogén
ypjJ	87082144	desconocido
ypjK	87082141	desconocido
yqfE	1789281	Reconstrucción del pseudogén, fragmento C-terminal, familia de LysR
yqiG	48994919	Reconstrucción del pseudogén, familia FimD, interrumpido por IS2I
yrdE	ninguno	Reconstrucción del pseudogén, fragmento C-terminal, parálogo de yedZ
yrdF	ninguno	Pseudogén, fragmento N-terminal
yrhA	87082266	Reconstrucción del pseudogén, interrumpido por IS1E
yrhC	87082273	Reconstrucción del pseudogén, fragmento N-terminal
ysaC	ninguno	Pseudogén, remanente C-terminal
ysaD	ninguno	Pseudogén, remanente de la secuencia interna
ytfA	1790650	Pseudogén, fragmento C-terminal
yzgL	87082264	Pseudogén, proteína de unión al soluto periplásmico putativa

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de metionina, que comprende las etapas de:

- cultivar un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae* modificado para una producción mejorada de metionina en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno, y

5

- recuperar la metionina o uno de sus derivados del medio de cultivo,

en donde dicho microorganismo se modifica para presentar una actividad de transhidrogenasa potenciada de PntAB por sobreexpresión de los genes que codifican PntAB.

- Condiciones de cultivo

- 10 Las expresiones "proceso fermentativo, 'cultivo' o 'fermentación'" se emplean de modo intercambiable para indicar el crecimiento de bacterias en un medio de cultivo apropiado que contiene una fuente de carbono simple, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno.

Un medio de cultivo apropiado es un medio apropiado para el cultivo y el desarrollo del microorganismo. Dichos medios se conocen en la técnica de fermentación de microorganismos, dependiendo del microorganismo que se ha de cultivar.

5 La expresión "fuente de carbono" de acuerdo con la invención indica cualquier fuente de carbono que puede usar el experto en la técnica para respaldar el desarrollo normal de un microorganismo, que puede consistir en hexosas tales como glucosa, galactosa o lactosa; pentosas; monosacáridos; disacáridos tales como sacarosa, celobiosa o maltosa; oligosacáridos; melasas; almidón o sus derivados; hemicelulosas; glicerol y sus combinaciones. Una fuente de carbono especialmente preferida es glucosa. Otra fuente de carbono preferida es sacarosa.

10 En particular, la fuente de carbono deriva de materia prima renovable. La materia prima renovable se define como materia prima requerida para determinados procesos industriales que se puede regenerar con una demora breve y en una cantidad suficiente para permitir su transformación en el producto deseado. La biomasa vegetal, tratada o no, es una fuente de carbono renovable interesante.

15 El término "fuente de azufre" de acuerdo con la invención se refiere a sulfato, tiosulfato, hidrógeno sulfuro, ditionato, ditionito, sulfito, metilmercaptano, dimetilsulfuro y otros sulfuros recubiertos con metilo o una combinación de las distintas fuentes. Más preferiblemente, la fuente de azufre en el medio de cultivo es sulfato o tiosulfato, o una mezcla de los mismos.

La expresión "fuente de nitrógeno" corresponde o bien a una sal de amonio o gas de amoníaco. La fuente de nitrógeno se suministra en la forma de amonio o amoníaco.

20 En particular, el cultivo se realiza en condiciones tales que el microorganismo se limita o se priva de un sustrato inorgánico, en particular fosfato y/o potasio. Someter un organismo a una limitación de un sustrato inorgánico define una condición bajo la cual el crecimiento de los microorganismos se rige por la cantidad de una sustancia química inorgánica provista que incluso permite el desarrollo débil. Privar a un microorganismo de un sustrato inorgánico define la condición bajo la cual el desarrollo del microorganismo cesa completamente debido a la ausencia del sustrato inorgánico.

25 La fermentación en general se lleva a cabo en fermentadores con un medio de cultivo apropiado adaptado al microorganismo que se esté usando, que contiene por lo menos una fuente de carbono simple y, si es necesario co-sustratos para la producción de metabolitos.

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

35 Como 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 lo definen Schaefer et al. (1999, Anal. Biochem. 270: 88-96).

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

40 ■ Recuperación de metionina

La acción de "recuperar la metionina del medio de cultivo" designa la acción de recuperar la metionina o uno de sus derivados, en particular SAM y NAM y todos los otros derivados que puedan ser útiles.

45 La presente descripción 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 permaneciendo en porciones o en la cantidad total (0-100%) en el producto final.

Después de la fermentación, L-metionina, sus precursores o compuestos derivados, se recupera/n y purifica/n si es necesario. Los métodos para la recuperación y purificación del compuesto producido tal como metionina, S-adenosil-metionina y N-acetil-metionina en el medio de cultivo se conocen en la técnica (WO 2005/007862, WO 2005/059155).

50 Opcionalmente, de 0 a 100%, preferentemente por lo menos 90%, más preferentemente 95%, incluso más preferentemente por lo menos 99% de la biomasa se puede retener durante la purificación del producto de fermentación.

Opcionalmente, el derivado de metionina N-acetil-metionina se transforma en metionina por desacilación, antes de recuperar la metionina.

Ejemplos

Protocolos

- 5 Se han utilizado varios protocolos para construir cepas que producen metionina y se describen en los siguientes ejemplos.

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

- 10 El reemplazo alélico o interrupción del gen en locus cromosómicos especificados se llevó a cabo por recombinación homóloga como lo describen Datsenko. & Wanner (2000). La resistencia de cloranfenicol (Cm) *cat*, la resistencia de kanamicina (Km) *kan*, o los genes *gm* de resistencia de gentamicina (Gt) flanqueados por los sitios de reconocimiento de F₁p, se ampliaron por PCR usando los plásmidos pKD3 o pKD4 o p34S-Gm (Dennis et Zyltra, AEM julio 1998, pág. 2710-2715) como molde, respectivamente. Los productos de PCR resultantes se usaron para transformar la cepa de *E. coli* receptora que aloja el plásmido pKD46 que expresa la recombinasa λ Red (γ , β , exo).
- 15 Los transformantes resistentes a los antibióticos se seleccionaron luego y la estructura cromosómica de los *locus* mutados se verificó por análisis PCR con los cebadores apropiados enumerados en la Tabla 2.

- 20 Los genes de resistencia a *cat*, *kan* y *gm* se eliminaron usando el plásmido pCP20 como lo describen Datsenko. & Wanner (2000), excepto que los clones que alojan el plásmido pCP20 se cultivaron a 37°C en LB y luego se ensayaron para pérdida de resistencia a antibióticos a 30°C. Los clones sensibles a los antibióticos se verificaron luego por PCR usando los cebadores enumerados en la Tabla 2

Protocolo 2: Transducción del fago P1

Se transfirieron modificaciones cromosómicas a una cepa determinada del recipiente de *E. coli* por transducción de P1. El protocolo está compuesto por 2 etapas: (i) preparación del lisado de fago en una cepa donante que contiene la modificación cromosómica asociada a la resistencia y (ii) la infección de la cepa receptora por este lisado de fago.

- 25 Preparación del lisado de fago

- Se inoculan 100 μ l de un cultivo de toda la noche 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 + glucosa 0,2% + CaCl₂ 5 mM.
- Se incuban 30 min a 37°C con agitación.
- Se añaden 100 μ l del lisado de fago P1 preparado en la cepa donante MG1655 (aprox. 1×10^9 fago/ml).
- 30 • Se agita a 37°C durante 3 horas hasta la lisis completa de las células.
- Se añaden 200 μ l de cloroformo y se agita en vórtex.
- Se centrifuga 10 min a 4500 g para eliminar los sedimentos celulares.
- Se transfieren del sobrenadante a un tubo estéril.
- Se conserva el lisado a 4°C.

- 35 Transducción

- Se centrifugan 10 min a 1500 g 5 ml de un cultivo de toda la noche de la cepa receptora de *E. coli* cultivada en medio LB.
- Se suspende el sedimento celular en 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM.
- 40 • Se infectan 100 μ l de células con 100 μ l del fago P1 de la cepa MG1655 con la modificación en el cromosoma (tubo de ensayo) y como tubos de control 100 μ l células sin el fago P1 y 100 μ l del fago P1 sin células.
- Se incuban 30 min a 30°C sin agitar.
- Se añaden 100 μ l de citrato de sodio 1 M en cada tubo, y se agita en vórtex.

- Se añade 1 ml de LB.
 - Se incuba 1 hora a 37°C con agitación.
 - Se centrifuga 3 min a 7000 rpm.
 - Se dispone en una placa de LB + Cm 30 µg/ml o Km 50 µg/ml o Gt 10µg/ml
- 5
- Se incuba a 37°C durante la noche.

Los transductores resistentes a antibióticos se seleccionaron luego y se verificó la estructura cromosómica del locus mutado por análisis PCR con los cebadores apropiados que se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 1: Genotipos y números correspondientes de cepas intermedias y cepas productoras que aparecen en los siguientes ejemplos.

Número de cepa	Genotipo
1 (comparativo)	MG1655 <i>metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA</i>
2 (comparativo)	MG1655 <i>metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE</i>
3 (comparativo)	MG1655 <i>metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm</i>
4 (comparativo)	MG1655 <i>metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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</i>
5 (comparativo)	MG1655 <i>metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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</i>
6 (comparativo)	MG1655 <i>metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC::Gt</i>
7 (comparativo)	MG1655 <i>metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36 metF::Km Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC::Gt</i>
8 (comparativo)	MG1655 <i>metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC:: TT02-serA-serC :: Gt ΔudhA ::Km</i>

Número de cepa	Genotipo
9	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 DtreBC:: TT02-serA-serC :: Gt Ptrc01-pntAB :: Cm ΔudhA ::Km</i>
10 (comparativo)	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 DtreBC::TT02-serA-serC</i>
11	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 DtreBC::TT02-serA-serC Ptrc01-pntAB::Cm</i>
12	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC ::TT02-serA-serC Ptrc01-pntAB ::Cm pCL1920-PgapA-pycRe-TT07</i>
13	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 DtreBC ::TT02-serA-serC Ptrc01-pntAB ::Cm ΔudhA ::Km</i>
14	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 AtreBC::TT02-serA-serCPtrc01-pntAB::Cm ΔudhA::Km</i>
15	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC Ptrc01-pntAB::Cm ΔudhA::KmpCL1920-PgapA-pycRe-TT07</i>
16	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 DtreBC::TT02-serA-serC Ptrc01-pntAB::ΔudhA</i>

Número cepa	de	Genotipo
17		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 ΔtreBC::TT02-serA-serC Ptrc30-pntAB::Cm ΔudhA
18		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 ΔtreBC::TT02-serA-serC Ptrc30-pntAB::CmΔudhApCL1920-PgapA-pycRe-TT07
19		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 ΔtreBC::TT02-serA-serC Ptrc97-pntAB::CmΔudhA
20		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 ΔtreBC::TT02-serA-serC Ptrc97-pntAB::Cm ΔudhApCL1920-PgapA-pycRe-TT07
21		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 ΔtreBC::TT02-serA-serC Ptrc55-pntAB :: CmΔudhA
22		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 ΔtreBC::TT02-serA-serC Ptrc55-pntAB::Cm ΔudhA pCL1920-PgapA-pycRe-TT07
23 (comparativo)		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 ΔtreBC::TT02-serA-serC ΔudhA::Km
24 (comparativo)		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-

Número de cepa	Genotipo
	<i>thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔtreBC::TT02-serA-serC ΔudhA::KmpCL1920-PgapA-pycRe-TT07</i>

Tabla 2: Cebadores utilizados para verificaciones PCR de las modificaciones cromosómicas anteriormente descritas

Nombre del gen	Nombre del cebador	SEC ID N°	Localización de la homología con la región cromosómica	Secuencias
malS	Ome0826-malS-F	1	3734778-3734800	GGTATTCCACGGGATTTTCGCG
	Ome0827-malS-R	2	3738298-3738322	CGTCAGTAATCACATTGCCTGTT GG
pgaABCD	Ome 1691-DpgaABCD_verif_F	11	1093002-1093020	GGGCTGATGCTGATTGAAC
	Ome-1692-DpgaABCD_verif_R	12	1084333-1084354	GTGTTACCGACGCCGTAAACGG
uxaCA	Ome 1612-uxaCA_R3	15	3238676-3238696	GGTGTGGTGGAATTCGTCG
	Ome 1774-DuxaCA_F	16	3243726-3243707	GCATTACGATTGCCCATACC
CP4-6	Ome 1775-DCP4-6_verif_F	22	259527-259546	GCTCGCAGATGGTTGGCAAC
	Ome 1776-DCP4-6_verif_R	23	297672-297691	TGGAGATGATGGGCTCAGGC
treBC	Ome 1595-DtreB-verif_F	27	4464951-4464930	GTTGCCGAACATTTGGGAGTGC
	Ome1596-DtreB verif_R	28	4462115-4462136	GGAGATCAGATTCACCACATCC
metF	Ome0726-PtrcmetF F	29	4130309-4130337	GCCCCGGTACTCATGTTTTCGGGT TTATGG
	Ome0727 PtrcmetF R	30	4130967-4130940	CCGTTATTCCAGTAGTCGCGTGC AATGG
udhA	Oag0055-udhAF2	33	4159070-4159053	GTGAATGAACGGTAACGC
	Oag0056-udhAR2	34	4157088-4157107	GATGCTGGAAGATGGTCACT
pntAB	Ome1151-pntAF	37	1676137-1676118	CCACTATCACGGCTGAATCG

Nombre del gen	Nombre del cebador	SEC ID N°	Localización de la homología con la región cromosómica	Secuencias
	Ome1152-pntAR	38	1675668-1675687	GTCCCAGGATTGAGTAACGC
wcaM	Ome1707-DwcaM verif_F	43	2115741-2115762	GCCGTTCAACACTGGCTGGACG
	Ome1708-DwcaM_verif_R	44	2110888-2110907	TGCCATTGCAGGTGCATCGC

I. Ejemplo 1 (comparativo): Construcción de la cepa 7, MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-metF::Km 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 ΔtreBC ::TT02-serA-serC ::Gt*

I.1. Construcción de la cepa 1

La cepa 1 que produce metionina (Tabla 1) se ha descrito en la solicitud de patente WO2007/077041.

I.2. Construcción de la cepa 2

El fragmento *TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* se insertó en el locus *malS* en dos etapas. Primero, se construyó el plásmido *pUC18-ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(35)-thrA*1-cysE::Km* y se introdujo en el cromosoma el segundo fragmento *TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km* que contenía secuencias en dirección 5' y en dirección 3' homólogas al locus *malS*. Posteriormente, se eliminó el cassette de resistencia de acuerdo con el Protocolo 1.

Todas las descripciones de las integraciones en los distintos locus en el cromosoma presentado a continuación siguen el mismo método; 1) construcción del vector de duplicación que contienen la secuencia homóloga en dirección 5' y en dirección 3' del locus de interés, el fragmento de ADN y un cassette de resistencia 2) construcción de cepa mínima (MG1655) que contiene la modificación cromosómica de interés y 3) transducción a la cepa del complejo (MG1655 que ya contiene varias modificaciones).

I.2.1. Construcción del plásmido *pUC18-ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km*

El plásmido *pUC18-ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(35)-thrA*1-cysE* deriva de los plásmidos *pSCB-TTadc-cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* y *pUC18-ΔmalS::MCS::Km* que se han descrito en la solicitud de patente PCT/FR2009/052520. En síntesis, el fragmento *TTadc-cl857-PlambdaR*(35)-thrA*1-cysE* digerido por *Apal*/*BamHI* se clonó entre los sitios *Apal* y *BamHI* de *pUC18-ΔmalS::MCS-Km*. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se denominó *pUC18-ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km*.

I.2.2. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km* (pKD46)

Para reemplazar el gen *malS* por el fragmento *TTadc-CI857-PlambdaR*(35)-thrA*1-cysE::Km* ADN, se digirió *pUC18-ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(35)-thrA*1-cysE::Km* por *ScaI* y *EcoRV*, y el fragmento digerido remanente *TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km* que contenía la secuencia en dirección 5' y en dirección 3' homóloga al locus *malS* se introdujo en la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 de conformidad con el Protocolo 1. Se seleccionaron los recombinantes resistentes a la kanamicina y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de *ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km* por PCR con los cebadores Ome 0826-*malS*-F (SEC ID N°1) y Ome 0827-*malS*-R (SEC ID N°2) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA*11* pKD46 *ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km*.

I.2.3. Transducción de *ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(35)-thrA*1-cysE::Km* en la cepa 1 y eliminación del cassette de resistencia

La modificación cromosómica de *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 Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA* con un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 *ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km* descrita anteriormente, de acuerdo con el Protocolo 2.

Se seleccionaron los transductores resistentes a kanamicina y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de *ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km* por PCR con los cebadores Ome 0826-

malS-F (SEC ID N°1) y Ome 0827-malS-R (SEC ID N°2) (Tabla 2). La cepa resultante posee el genotipo MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE::Km*. Finalmente, la resistencia a la kanamicina de la cepa anterior se eliminó de acuerdo con el Protocolo 1. La pérdida del cassette resistente a kanamicina se verificó por PCR usando los cebadores Ome 0826-malS-F (SEC ID N°1) y Ome 0827-malS-R (SEC ID N°2) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* se denominó cepa 2.

I.3. Construcción de la cepa 3

- 10 I.3.1. Construcción del plásmido pUC18-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm

El plásmido pUC18-ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm deriva de los plásmidos pCL1920-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 y pUC18-ΔpgaABCD::TT02-MCS::Cm que se describen a continuación.

- 15 Construcción del plásmido pCL1920-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11

El plásmido pCL1920-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 deriva del plásmido pCL1920-TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 descrito en la solicitud de patente PCT/FR2009/052520.

- 20 Para construir el plásmido pCL1920-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11, se amplió el plásmido pCL1920-TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 con los cebadores PR-RBS01_F (SEC ID N°3) y TTadc-pCL1920_R (SEC ID N°4). El producto de PCR se digirió por *DpnI* con el fin de eliminar el molde de ADN parental. El alerón cohesivo remanente se fosforiló y se introdujo en la cepa de *E. coli* para formar el plásmido pCL1920-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11. El inserto de TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 y especialmente la presencia de la secuencia RBS01 en dirección 5' del gen *thrA* se verificaron por secuenciación de ADN, usando los siguientes cebadores.

- 25 PR-RBS01_F (SEC ID N°3)

ACGTTAAATCTATCACCGCAAGGGATAAATATCTAACACCGTGCGTGTTGACA
ATTTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGCATGTACTAAGGAGGTTATAAATGA
GAGTGTTGAAGTTCGG

con

- 30 • secuencia en letra mayúscula homóloga al promotor P_R del bacteriófago lambda (*PlambdaR*(-35)*), (Mermet-Bouvier & Chauvat, 1994, Current Microbiology, vol. 28, pág 145-148 ; Tsurimoto T, Hase T, Matsubara H, Matsubara K, Mol Gen Genet. 1982;187(1):79-86).

• secuencia en letra mayúscula subrayada correspondiente a la secuencia RBS01 con un sitio de restricción *PsiI*

• secuencia en letra mayúscula en negrita homóloga al extremo 5' de *thrA* (1-20)

TTadc-pCL1920_R (SEC ID N°4)
TAAAAAAAAATAAGAGTTACCATTAAAGGTAACCTCTTATTTTTAGGGCCCCGTA

- 35 CCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGC

con

• secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia del terminador de transcripción TTadc (terminador de transcripción del gen *adc* de *Clostridium acetobutylicum*, homólogo de 179847 a 179807 del megaplásmido pSLO1).

- 40 • secuencia en letra mayúscula en negrita homóloga al plásmido pCL1920-TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11

Construcción del plásmido pUC18-ΔpgaABCD::TT02-MCS::Cm

Para construir el fragmento $\Delta pgaABCD::TT02-MCS::Cm$, la región en dirección 5' de *pgaA* (*uppgaA*), el terminador de transcripción *TT02*, el sitio de clonación múltiple (MCS) y la región en dirección 3' de *pgaD* (*downpgaD*) se unieron por PCR. El cassette de cloranfenicol (*Cm*) se amplió posteriormente y se añadió al constructo previo.

Primero, se amplió *uppgaA-TT02* de ADN genómico de *E. coli* MG1655 usando los cebadores Ome 1687- $\Delta pgaABCD_amont_EcoRI_F$ (SEC ID N°5) y Ome 1688- $\Delta pgaABCD_amont_TT02_BstZ17I_R$ (SEC ID N°6) por PCR. Luego, el fragmento *TT02-MCS-down-pgaD* se amplió a partir del ADN genómico de *E. coli* MG1655 usando los cebadores Ome 1689- $\Delta pgaABCD_aval_MCS_BstZ17I_F$ (SEC ID N°7) y Ome 1690- $\Delta pgaABCD_aval_EcoRI_R$ (SEC ID N°8) por PCR. Los cebadores Ome 1688- $\Delta pgaABCD_amont_TT02_BstZ17I_R$ (SEC ID N°6) y Ome 1689- $\Delta pgaABCD_aval_MCS_BstZ17I_F$ (SEC ID N°7) se diseñaron para superponerse en una región de 36 nucleótidos de longitud. Finalmente, el fragmento *uppgaA-TT02-MCS-down-pgaD* se amplió mezclando los productos de ampliación *uppgaA-TT02* y *TT02-MCS-down-pgaD* usando los cebadores Ome 1687- $\Delta pgaABCD_amont_EcoRI_F$ (SEC ID N°5) y Ome 1690- $\Delta pgaABCD_aval_EcoRI_R$ (SEC ID N°8). El producto de PCR de fusión resultante se digirió por *HpaI* y se clonó entre *HindIII* y *EcoRI* del plásmido pUC18 que se había tratado con el Fragmento Large (Klenow) de ADN Polimerasa I de *E. coli*. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pUC18- $\Delta pgaABCD::TT02-MCS$.

Ome 1687- $\Delta pgaABCD_amont_EcoRI_F$ (SEC ID N°5)

CGTAGTTAACGAATTCGACTAGAAAGTATGTGAGCAACTATCGGCCCCCC
con

- secuencia de letra mayúscula en negrita para el sitio de restricción *HpaI* y *EcoRI* y extrabases,

- secuencia en letra mayúscula homóloga al gen *pgaA* en dirección 5' (1092609-1092576, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Ome 1688- $\Delta pgaABCD_amont_TT02_BstZ17I_R$ (SEC ID N°6)

GCTTGTATACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTTCGACTGAGCCTTTTCG
TTTTATTTGATGAGGCTGCGCTACGGCACTCACGG

con

- secuencia en letra mayúscula en negrita para el sitio de restricción *BstZ17I* y extrabases,
- secuencia en letra mayúscula en negrita correspondiente al terminador de transcripción *T₁* de *E. coli rrmB* (Orosz A, Boros I y Venetianer P. Eur. J. Biochem. 1991 Nov 1;201(3):653-9)
- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *pgaA* (1091829-1091851, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Ome 1689- $\Delta pgaABCD_aval_MCS_BstZ17I_F$ (SEC ID N°7)

AGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTATACAAGCTTAATTAAGGGCCCCGG
GCGGATCCCCCAAACAAAGCCCGGTTTCGC

con

- secuencia en letra mayúscula en negrita complementaria a la secuencia del extremo 3' del terminador de transcripción *T₁* de *E. coli rrmB* (Orosz A, Boros I y Venetianer P. Eur. J. Biochem. 1991 Nov 1;201(3):653-9),

- secuencia en letra mayúscula subrayada que contiene un sitio de clonación múltiple MCS: *BstZ17I*, *HindIII*, *PacI*, *Apal*, *BamHI*,

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *pgaD* (1085325-1085304, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Ome 1690- $\Delta pgaABCD_aval_EcoRI_R$ (SEC ID N°8)

CGTAGTTAACGAATTCAGCTGATATTCGCCACGGGC

con

- secuencia en letra mayúscula en negrita para los sitios de restricción *HpaI* y *EcoRI* y extrabases,

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *pgaD* (1084714-1084733, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Finalmente, los cebadores Ome 1603- K7_Cm_ampl_Smal_BstZ17I_F (SEC ID N°9) y Ome 1604-K7_Cm_ampl HindIII_R (SEC ID N°10) se usaron para ampliar el cassette de cloranfenicol y las secuencias FRT del plásmido pKD3, y el fragmento se clonó entre los sitios *BstZ17I* y *HindIII* del plásmido pUC18- Δ *pgaABCD*::TT02-MCS. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pUC18- Δ *pgaABCD*::TT02-MCS::Cm.

Ome 1603- K7_Cm_ampl_Smal_BstZ17I_F (SEC ID N°9)

TCCCCCGGGTATACTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
Con

- 10• secuencia en letra mayúscula subrayada para el sitio de restricción *BstZ17I* y *SmaI* y extrabases,
- secuencia en letra mayúscula correspondiente al cebador del sitio 1 del plásmido pKD3 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

Ome 1604-K7_Cm_ampl_HindIII_R (SEC ID N°10)

GCCCAAGCTTCATATGAATATCCTCCTTAG

15 con

- secuencia en letra mayúscula subrayada *HindIII* para el sitio de restricción y extrabases,
- secuencia en letra mayúscula correspondiente al cebador del sitio 2 del plásmido pKD3 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Construcción de pUC18- Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA *11::Cm

- 20 Para construir pUC18- Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm, *Apal*/*Bam*HI, se clonó el fragmento TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 aislado de pCL1920-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 anteriormente descrito, entre los sitios *Apal* y *Bam*HI del plásmido pUC18- Δ *pgaABCD*::TT02-MCS::Cm anteriormente descrito. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pUC18- Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA *1-cysE-PgapA-metA *11::Cm.
- 25

I.3.2. Construcción de la cepa MG1655 metA*11 Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm (pKD46)

- 30 Para reemplazar el operón *pgaABCD* por la región TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm, se digirió pUC18- Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm por las enzimas de restricción *SapI* y *AatII* y el fragmento digerido remanente Δ *pgaABCD*:: TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm se introdujo en la cepa MG1655 metA*11 pKD46 de conformidad con el Protocolo 1.

- 35 Se seleccionaron los recombinantes resistentes al cloranfenicol y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA *1-cysE-PgapA-metA*11::Cm por PCR con los cebadores Ome 1691-DpgaABCD_verif_F (SEC ID N°11) y Ome 1692-DpgaABCD_verif_R (SEC ID N°12) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 metA*11 Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm (pKD46).

I.3.3. Transducción de Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA -metA*11::Cm en la cepa 2

- 40 La modificación cromosómica de Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm se transdujo a la cepa 2 (Tabla 1), previamente descrita, con un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 metA*11 pKD46 Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm anteriormente descrita, de conformidad con el Protocolo 2.

- 45 Se seleccionaron los transductores resistentes al cloranfenicol y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm por PCR con Ome 1691-DpgaABCD_verif_F (SEC ID N°11) y Ome 1692-DpgaABCD_verif_R (SEC ID N°12) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 metA*11 P_{trc}-metH P_{trc}F-cysPUWAM P_{trc}F-cysJiH P_{trc}09-gcvTHP P_{trc}36-ARNmst17-metF

Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-PlamhdaR(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km* se denominó cepa 3.

I.4. Construcción de la cepa 4

- 5 I.4.1. Construcción del plásmido pUC18-*ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km*

Para construir el plásmido pUC18-*ΔuxaCA::TT07-MCS-Km*, se obtuvo el fragmento *ΔuxaCA::TT07-MCS-Km* por PCR usando ADN genómico de *E.coli* MG1655 *ΔuxaCA::TT07-MCS-Km* como molde y se clonó en pUC18 (Norrander et al., 1983, Gene 26,101-106).

Construcción de la cepa MG1655 *ΔuxaCA::TT07-MCS-Km* pKD46

- 10 Para reemplazar la región *uxaCA* por el fragmento TT07-MCS-Km, se usó el Protocolo 1, excepto que se emplearon los cebadores Ome 1506-DuxaCA-MCS-F (SEC ID N°13) y Ome 1507-DuxaCA-MCS-R (SEC ID N°14) para ampliar el cassette de resistencia a la kanamicina del plásmido pKD4.

Ome 1506-DuxaCA-MCS-F (SEC ID N°13)

GCAAGCTAGCTCACTCGTTGAGAGGAAGACGAAAATGACTCCGTTTATGACTGAAGA
TTTCCTGTTAGATACCGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCTGTA
GGCTGGAGCTGCTTCG

- 15 con

- secuencia en letra mayúscula cursiva homóloga a la secuencia en dirección 5' del locus *uxaCA* (3242797-3242724, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org>),

- secuencia en letra mayúscula subrayada para la secuencia de transcripción T7Te del fago T7 (Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Abril 24;98(9):5019-24.),

- 20 • secuencia en letra mayúscula correspondiente al sitio del cebador 2 del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Ome 1507-DuxaCA-MCS-R (SEC ID N°14)

TTAAACAACCTCATTTTCGACTTTATAGCGTTACGCCGCTTTTGAAGATCGCCGAATTTCG
AGCTCGGTACCCGGGGATCCATCTCGAGATCCGCGGATGTATACATGGGCCCC
ATATGAATATCCTCCTTAG

con

- 25 • secuencia en letra mayúscula en cursiva homóloga a la secuencia en dirección 3' del locus *uxaCA* (3239830-3239879, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>),

- una región (letra mayúscula subrayada) para el MCS que contiene la secuencia de los sitios de restricción *Apal*, *BstZ17I*, *SacII*, *XhoI*, *AvaI*, *BamHI*, *SmaI*, *KpnI*, *SacI*, *EcoRI*,

- 30 • letra mayúscula correspondiente al sitio del cebador 1 del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

Se seleccionaron los recombinantes resistentes a la kanamicina y se verificó la inserción del cassette de resistencia por PCR con los cebadores Ome 1612-*uxaCA_R3* (SEC ID N°15) y Ome 1774-DuxaCA_F (SEC ID N°16) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *ΔuxaCA::TT07-MCS-Km* pKD46.

- 35 Construcción del plásmido pUC18-*ΔuxaCA::TT07-MCS::Km*

La región *ΔuxaCA::TT07-MCS-Km* se amplió por PCR de ADN genómico de *E. coli* MG1655 *ΔuxaCA::TT07-MCS-Km* anteriormente descrito como molde con los cebadores Ome 1515-*uxaCA-R2* (SEC ID N°17) y Ome 1516-*uxaCA-F2* (SEC ID N°18).

Ome 1515-*uxaCA R2* (SEC ID N°17)

CCCACTGGCCTGTAATATGTTCCGG, homólogo a la secuencia en dirección 3' del locus *uxaCA* (3239021-3239044)

Ome 1516-*uxaCA* F2 (SEC ID N°18)

ATGCGATATCGACCGTATAAGCAGCAGAAATAGGC
con

- 5 • la secuencia en letra mayúscula subrayada para el sitio de restricción *EcoRV* y extra-bases
- secuencia en letra mayúscula en cursiva homóloga a la secuencia en dirección 5' del locus *uxaCA* (3243425-3243402)

Luego, el producto de PCR resultante (obtenido con una ADN polimerasa de extremo romo) se digirió por la enzima de restricción *EcoRV* y se clonó en el sitio *SmaI* de pUC18. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pUC18-*ΔuxaCA::TT07-MCS-Km*.

Construcción de pUC18-*ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA *11::Km*

- 15 Para construir pUC18-*ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA *11::Km*, el fragmento digerido de *TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA *1-cysE-PgapA-metA *11* *Apal/BamHI* de pCL1920-*TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* previamente descrito se clonó en los sitios *Apal* y *BamHI* de pUC18-*ΔuxaCA::TT07-MCS-Km* precedentemente descritos. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pUC18-*ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA *11::Km*

I.4.2. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* (pKD46)

- 20 Para reemplazar el operón *uxaCA* por la región *TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km*, se digirió pUC18-*ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km* por *BamHI* y *AhdI*, y el fragmento digerido remanente *ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km* se introdujo en la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 de conformidad con el Protocolo 1.

- 25 Se seleccionaron los recombinantes resistentes a la kanamicina y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de *ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA *11::Km* por PCR con los cebadores Ome 1612-*uxaCA_R3* (SEC ID N°15) y Ome 1774-*DuxaCA_F* (SEC ID N°16) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa resultante se designó MG1655 *metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA *1-cysE-PgapA-metA *11::Km* (pKD46)

I.4.3. Transducción de *ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km* en la cepa 3

- 30 La modificación cromosómica de *ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA *1-cysE-PgapA-metA *11::Km* se transdujo a la cepa 3 (Tabla 1), precedentemente descrita, con un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 *ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA *1-cysE-PgapA-metA *11::Km* anteriormente descrita, de conformidad con el Protocolo 2.

- 35 La modificación cromosómica de *ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA *1-cysE-PgapA-metA *11::Km* se verificó por PCR con Ome 1612-*uxaCA_R3* (SEC ID N°15) y Ome 1774-*DuxaCA_F* (SEC ID N°16) (Tabla 2). La cepa resultante se denominó 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::Cm ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA *1-cysE-PgapA-metA *11::Km*

- 40 Finalmente, los cassettes de cloranfenicol y resistentes a la kanamicina de la cepa anteriormente mencionada se eliminaron de acuerdo con el Protocolo 1. La pérdida de los cassettes de cloranfenicol y resistencia a kanamicina se verificaron por PCR con los cebadores Ome 1691-*DpgaABCD_verif_F* (SEC ID N°11), Ome 1692-*DpgaABCD_verif_R* (SEC ID N°12), Ome 1612-*uxaCA_R3* (SEC ID N°15) y Ome 1774-*DuxaCA_F* (SEC ID N°16) (Tabla 2). La cepa resultante 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* se denominó cepa 4.

I.5. Construcción de la cepa 5

I.5.1. Construcción del plásmido pMA-DCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-thru *1-cysE-PgapA-metA *11::Km

Plásmido pMA- Δ CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-thrA *1-cysE-PgapA-metA *11::Km derivado de pCL1920-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 anteriormente descrito y pMA- Δ CP4-6::TT02-MCS::Km descrito a continuación.

Construcción del plásmido pMA- Δ CP4-6::TT02-MCS::Km

- 5 Primero se sintetizó pMA- Δ CP4-6::TT02-MCS mediante GeneArt (<http://www.geneart.com/>). El fragmento Δ CP4-6::TT02-MCS se clonó en los sitios *Ascl* y *Pacl* del plásmido pMA de GeneArt y contiene la siguiente secuencia identificada como SEC ID N° 19:

ggcgcgccaggcctagggCCGACGATGTACGTCAGGTGTGCAACCTCGCCGATCCGGTG
GGGCAGGTAATCGATGGCGGCGTACTGGACAGCGGCCTGCGTCTTGAGCGTCCG
TTCGCGTACCGCTGGGGGTTATTGGCGTGATTTATGAAGCGCGCCCCGAACGTGA
CGGTTGATGTGCTTCGCTGTGCCTGAAAACCGGTAATGCGGTGATCCTGCGC
GGTGGCAAAGAAACGTGTGCGACTAACGCTGCAACGGTGGCGGTGATTCAGG
ACGCCCTGAAATCCTGCGGCTTACCGGGCGGGTGCCGTGCAGGCGATTGATAAT
CCTGACCGTGCGCTGGTCAGTGAAATGCTGCGTATGGATAAATACATCGACAT
GCTGATCCCGCGTGGTGGCGCTGGTTTGCATAAACTGTGCCGTGAACAGTCGA
CAATCCCGGTGATCACAGGTGGTATAGGCGTATGCCATATTTACGTTGATGAA
AGTGTAGAGATCGCTGAAGCATTAAAAGTGATCGTCAACGCGAAAACTCAGCG
TCCGAGCACATGTAATACGGTTGAAACGTTGCTGGTGAATAAAAAACATCGCCG
ATAGCTTCCTGCCCCGATTAAGCAAACAAATGGCGGAAAGCGGCGTGACATTA

CACGCAGATGCAGCTGCACTGGCGCAGTTGCAGGCAGGCCCTGCGAAGGTGGT
TGCTGTTAAAGCCGAAGAGTATGACGATGAGTTTCTGTCATTAGATTTGAACGT
CAAAATCGTCAGCGATCTTGACGATGCCATCGCCCATATTCGTGAACACGGCA
CACAACACTCCGATGCGATCCTGACCCGCGATATGCGCAACGCCCAGCGTTTT
GTTAACGAAGTGGATTTCGTCCGCTGTTTACGTTAACGCCTCTACGCGTTTTACC
GACGGCGGCCAGTTTGGTCTGGGTGCGGAAGTGGCGGTAAGCACACAAAAAC
TCCACGCGCGTGGCCCAATGGGGCTGGAAGCACTGACCACTTACAAGTGGATC
GGCATTGGTGATTACACCATTCGTGCGTAACATCAAATAAAACGAAAGGCTC
AGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTATACAAGCTTAATAAGGG
CCCGGGCGGATCCCACCACGTTTCCTCCTGTGCCGTATTTGTGCCATTGTAACC
TTGGCAATTCATCAAAATACTGTTCTGACATCAGGCAGTGCAGGTGCAGACAT
TTAAGCCAATTGCTGCCGCCATTCTTTGACGTAGTCAATCAGGGCGCGGAGCTT
TGGTGCAATATTGCGACGCTGTGGGAAATACAGATAGAAGCCCGGAAATTGTG
GAAGAAAGTCATCAAGCAGCGATACAAGTTTACCGCTTCAATATATGGCCTG
AAAGTTTCCTGAGTGGCAATTGTTATTCCTCCGCGGCAAGAGCCAGCCTCAA
CATCAGACGCAGATCATTAGTCGTAATCTGCGGTTCAATCGCAAGGTCGAAAG
TTCTCCCGTTTTCTTCAAATGGCCAGCGATAAGGCGCAACCTCCGGGGACTGAC
GCCAGCCGATACACTTATGGGTATTTCCCCCGGAGGCGAGAAAGCACTCTCCA
CGCCCGGCCGCAAGGATCAGGACGACGGGGGCAGGCATGAATCCTCCTCCTG
ATGGAGACGTACAGAGGCGACTTCTGCCAGCACGGAGAGTGCCAGAGTATGC
GCATCCCGGGCTTTGGGGAATATCCCGACGGGTGCCCGGATTTGCGTTGTTTCC
TCCCTGGACCATCCAGCTCGTGGAGCTTTTGCAGACGTAACGTGTGGGTTCGA
TAGCTGCCCAATGCGCCGAGATAAAAGGGTTTTGCTTCTCGCGCGGCCTGCAA
CACTGGCAGCTCCCGGTTGAGATCATGGCACAGCAAAATGACCGCCGTATCGG
TATCGATCTGAGCGCTGGCTGAGGCGGAAAAAGATCGAAGATATGGCTGTCA
TAGCCTGTGGCTGCTGCAAGACTCGCGGTTGCCTGCGCCTCAAGAGAACGTCC
GTAAATCATCAGCCTGACGCATGGCCTGAACCCACCTCAAAGCCATTGAGAT
TCCAGCCCGTCCGGGTTTGCCTGGGCAGGCACACCAGCGATTGTGCTTGCGGA
TCGTAGCGCAGCCCCACCGGTTTTCTCTGTTCCAGGCGGTTACGACGGCGAG
CAGAGGCTGTGCCGAGCGTAGggtacctttaattaa

letra minúscula correspondiente a los sitios de restricción *Ascl*, *StuI* y *AvrII*

- letra minúscula subrayada homóloga a la secuencia en dirección 5' del locus *CP4-6* (260955-261980, <http://ecogene.org/>).

5 ○ letra mayúscula en negrita correspondiente a la secuencia del terminador de transcripción *TT02* de *T₁* del gen de *E. coli* *rmB* (Orosz A, Boros I y Venetianer P. Eur. J. Biochem. 1991 Nov 1;201(3):653-9)

- secuencia en letra mayúscula cursiva correspondiente a MCS que contiene los sitios de restricción *Bst*Z17I, *Hind*III, *Apal*, *Sma*I y *Bam*H1

10 • letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 3' del locus *CP4-6* (296511-297581, <http://ecogene.org/>)

- letra minúscula subrayada correspondiente a los sitios de restricción *Kpn*I y *Pac*I.

Se usaron los segundos cebadores Ome 1605-K7_Km_ampl_SmaI_BstZ17I_F (SEC ID N°20) y Ome 1606-K7_Km_ampl_HindIII_R (SEC ID N°21) para ampliar el cassette de kanamicina del plásmido pKD4 que

posteriormente se clonó entre los sitios *Bst*Z171 y *Hind*III de pMA-ΔCP4-6::TT02-MCS. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se llamó pMA-ΔCP4-6::TT02-MCS-Km.

Ome 1605-K7_Km_ampl_SmaI_BstZ171_F (SEC ID N°20)

TCCCCCGGGGTATACCATATGAATATCCTCCTTAG
con

- secuencia en letra mayúscula subrayada para los sitios de restricción *Bst*Z171 y *Sma*I y extrabases,
- secuencia en letra mayúscula correspondiente al cebador del sitio 1 del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

Ome 1606-K7_Km_ampl_HindIII_R (SEC ID N°21)

GCCCAAGCTTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

con

- secuencia en letra mayúscula subrayada para el sitio de restricción *Hind*III y extrabases,
- secuencia en letra mayúscula correspondiente al cebador del sitio 2 del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

Para construir pMA-ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km, el fragmento digerido de TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 *Apal*/*Bam*HI de pCL1920-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 anteriormente descrito se clonó en los sitios *Apal* y *Bam*HI de pMA-ΔCP4-6::TT02-MCS-Km anteriormente descrito. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pMA-ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km

I.5.2. Construcción de la cepa MG1655 metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km (pKD46)

Para reemplazar el operón CP4-6 por el fragmento TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km, se digirió el plásmido pMA-ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km por *Kpn*I y *Avr*II, y el fragmento digerido remanente ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km se introdujo en la cepa MG1655 metA*11 pKD46 de conformidad con el Protocolo 1.

Se seleccionaron los recombinantes resistentes a kanamicina y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km por PCR con los cebadores Ome1775-ΔCP4-6_verif_F (SEC ID N°22) y Ome1776-ΔCP4-6_verif_R (SEC ID N°23) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa resultante se llamó MG1655 metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km (pKD46)

I.5.3. Transducción de ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km a la cepa 4 y eliminación del cassette de resistencia.

La modificación cromosómica de ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km se transdujo a la cepa 4 (Tabla 1), anteriormente descrita, con un lisado del fago PI de la cepa MG1655 metA*11 pKD46 ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km anteriormente descrita, de acuerdo con el Protocolo 2. Se seleccionaron los transductores resistentes a kanamicina, y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km por PCR con Ome1775-ΔCP4-6_verif_F (SEC ID N°22) y Ome1776-ΔCP4-6_verif_R (SEC ID N°23) (Tabla 2). La cepa resultante se denominó MG1655 metA*11 *P*trc-metH *P*trcF-cysPUWAM *P*trcF-cysJIH *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-metF *P*trc07-serB Δ*metJ* Δ*pykF* Δ*pykA* Δ*purU* Δ*yncA* Δ*malS*::TTadC-Cl857-PlambdaR*(35)-thrA*1-cysE Δ*pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ*uxaCA*::TT07-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Km..

Finalmente, el cassette de resistencia a kanamicina de la cepa anteriormente mencionada se eliminó usando el Protocolo 1. La pérdida del cassette de resistencia a kanamicina se verificó por PCR usando los cebadores Ome1775-ΔCP4-6_verif_F (SEC ID N°22) y Ome1776-ΔCP4-6_verif_R (SEC ID N°23) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 metA*11 *P*trc-metH *P*trcF-cysPUWAM *P*trcF-cysJIH *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-metF *P*trc07-serB Δ*metJ* Δ*pykF* Δ*pykA* Δ*purU* Δ*yncA* Δ*malS*::TTadC-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE Δ*pgaABCD*::TT02-TTadC-

PlambdaR *(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ uxaCA::TT07-TTadC-*PlambdaR* *(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ CP4-6::TT02-TTadC-*PlambdaR**(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 se denominó cepa 5.

I.6. Construcción de la cepa 6

- 5 Para insertar la región *TT02-serA-serC*, que codifica una fosfoglicerato deshidrogenasa de *E. coli* y una fosfoserina aminotransferasa, respectivamente, en el locus *treBC*, se empleó un método de dos etapas. Primero, se construyó el plásmido pMA- Δ *treBC*::*TT02-serA-serC*::*Gt* y luego el fragmento Δ *treBC*::*TT02-serA-serC*::*Gt* que contiene las regiones en dirección 5' y en dirección 3' homólogas al locus *treBC* se recombinaron en el cromosoma de acuerdo con el Protocolo 1.

I.6.1. Construcción del plásmido pMA- Δ *treBC*::*TT02-serA-serC*::*Gt*

- 10 Plásmido pMA- Δ *treBC*::*TT02-serA-serC*::*Gt* derivado de pMA- Δ *treBC*::*TT02-MCS*::*Gt* descrito a continuación, p34S-Gm (Dennis et Zylstra, AEM julio 1998, pág 2710-2715), y pUC18-*serA-serC*, que se ha descrito en la solicitud de patente PCT/FR2009/052520.

- 15 Primero, el plásmido pMA- Δ *treBC*::*TT02-MCS* se sintetizó mediante GeneArt (<http://www.geneart.com/>). El fragmento Δ *treBC*::*TT02-MCS* se clonó en los sitios *AscI* y *PacI* del plásmido pMA de GeneArt y que contiene la siguiente secuencia, identificada como SEC ID N° 24:

ggcgcgccgGCAATCAAAATCCTGATGCAACGGCTGTATGACCAGGGGCATCGTAA
TATCAGTTATCTCGGCGTGCCGCACAGTGACGTGACAACCGGTAAGCGACGTC
ACGAAGCCTACCTGGCGTTCTGCAAAGCGCATAAACTGCATCCCGTTGCCGCC
CTGCCAGGGCTTGCTATGAAGCAAGGCTATGAGAACGTTGCAAAAGTGATTAC
GCCTGAAACTACCGCCTTACTGTGCGCAACCGACACGCTGGCACTTGGCgcaagta
aatacctgcaagagcaacgcacgcacacctgcaactggcgagcgctcgtaatacgccgtaataaattcctccatccggagatc
gtaaccgtagatcccggttacgccgaagctggacgccaggcggttgccagttgatcgcgaggttaaccggcgagcgaacc
gcaacaaatcatcatcccgccaccctgtctgatcggttctgaacgataaattgtgatctCATCAAATAAAACGA
AAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTATACAAGCTT
ATAAGGGCCCCGGGCGGATCCGTCTGTCAGTATGTTGTTTTTGTGATTTTTTCAA
CCAGCAAATTCATTAAAAAATTTACATATCGCTGTAGCGCCCGTCATCCGTACG
CTCTGCTTTTTACTTTGAGCTACATCAAAAAAGCTCAAACATCCTTGATGCAA
AGCACTATATATAGACTTTAAAATGCGTCCCAACCCAATATGTTGTATTAATCG
ACTATAATTGCTACTACAGCTCCCCACGAAAAAGGTGCGGCGTTGTGGATAAG
CGGATGGCGATTGCGGAAAGCACCGGAAAACGAAACGAAAAACCGGAAAAC
GCCTTTCCCAATTTCTGTGGATAACCTGTTCTTAAAAATATGGAGCGATCATGA
CACCGCATGTGATGAAACGAGACGGCTGCAAAGTGCCGTTTAAATCAGAGCGC
ATCAAAGAAGCGATTCTGCGTGCAGCTAAAGCAGCGGAAGTCGATGATGCCG
ATTATTGCGCCACTGTTGCCGCGGTTGTGAGCGAGCAGATGCAGGGCCGCAAC
CAGGTGGATATCAATGAGATCCAGACCGCAGTTGAAAATCAGCTGttaattaa

- letra minúscula correspondiente al sitio de restricción *AscI*
- letra mayúscula subrayada homóloga a la secuencia en dirección 5' del locus *treBC* (4460477-4461034).
- letra mayúscula en negrita correspondiente a la secuencia del terminador de transcripción TT02 del terminador *T₁* del gen de *E. coli* *rrnB* (Orosz A, Boros I and Venetianer P. Eur. J. Biochem. 1991 Nov 1;201(3):653-9)
- letra mayúscula en cursiva correspondiente a múltiples sitios de clonación que contienen los sitios de restricción *BstZ17I*, *HindIII*, *Apal*, *SmaI* and *BamHI*
- letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 3' del locus *treBC* (4464294-4464787)
- 25 • letra minúscula en cursiva correspondiente al sitio de restricción *PacI*

Para construir el plásmido pMA- $\Delta treBC::TT02$ -MCS ::Gt, se amplió el cassette de resistencia FRT-Gt-FRT por PCR con los cebadores BstZ17I-FRT-Gt-F (SEC ID N°25) y HindIII-FRT-Gt-R (SEC ID N°26) usando p34S-Gm como molde.

BstZ17I-FRT-Gt-F (SEC ID N°25)

TCCCCCGGGGTATACTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTC
TAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCATTTAGATGGGTACCGAGCT

5 CGAATTG

con

- secuencia en letra mayúscula subrayada para los sitios de restricción *Sma*I y *Bst*Z17I y extrabases,
 - secuencia en letra mayúscula en negrita correspondiente a la secuencia FRT (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)
- 10 • secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia del gen de gentamicina ubicado en p34S-Gm (Dennis et Zyltra, AEM julio 1998, pág. 2710-2715).

HindIII-FRT-Gt-R (SEC ID N°26)

CCCAAGCTTCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTC
TCTAGAAAGTATAGGAACTTCGGCGCGGATGGGTACCGAGCTCGAATTG

con

- 15 • secuencia en letra mayúscula subrayada para el sitio de restricción *Hind*III y extrabases,
- secuencia en letra mayúscula en negrita correspondiente a la secuencia FRT (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)
 - secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia del gen de gentamicina ubicado en p34S-Gm (Dennis et Zyltra, AEM julio 1998, pág. 2710-2715).

20 El producto FRT-Gt-FRT PCR se clonó luego entre los sitios *Bst*Z17I y *Hind*III de pMA- $\Delta treBC::TT02$ -MCS. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pMA- $\Delta treBC::TT02$ -MCS-Gt.

Para construir el plásmido final pMA- $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt, se digirió pUC18-serA-serC por *Hind*III y el fragmento digerido de serA-serC se clonó en pMA- $\Delta treBC::TT02$ -MCS-Gt que se había linealizado por *Hind*III. El plásmido resultante se verificó por digestión y por secuenciación de ADN y se denominó pMA- $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt

25

I.6.2. Construcción de la cepa MG1655 metA*11 pKD46 $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt

Para reemplazar el gen *treBC* por el fragmento $TT02$ -serA-serC::Gt, se digirió pMA- $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt por *Ap*I y *Sa*I, y el fragmento digerido remanente $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt se introdujo en la cepa MG1655 metA*11 pKD46 de conformidad con el Protocolo 1.

30 Se seleccionaron los recombinantes resistentes a gentamicina y se verificó la presencia del fragmento $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt por PCR con los cebadores Ome 1595-DtreB_verif_F (SEC ID N°27) y Ome 1596-DtreB_verif_R (SEC ID N°28) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa resultante se denominó MG1655 metA*11 pKD46 $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt.

I.6.3. Transducción de $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt en la cepa 5

35 La modificación cromosómica de $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt se transdujo luego a la cepa 5 (Tabla 1) con un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 metA*11 pKD46 $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt anteriormente descrita, de acuerdo con el Protocolo 2.

Se seleccionaron los transductores resistentes a gentamicina y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de $\Delta treBC::TT02$ -serA-serC::Gt por PCR con Ome 1595-DtreB_verif_F (SEC ID N°27) y Ome 1596-DtreB_verif_R (SEC ID N°28) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 metA*11 *P*trc-metH *P*trcF-cysPUWAM *P*trcF-cysJIH *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-metF *P*trc07-serB Δ metJ Δ pykF Δ pykA Δ purU Δ yncA Δ malS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE Δ pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR *(-35)-RBS01-thrA *1-cysE-PgapA-metA

40

**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 ΔtreBC::TT02-serA-serC::Gt* se denominó cepa 6.

I.7. Construcción de la cepa 7 por transducción de *Ptrc36-metF::Km* en la cepa 6

- 5 La sobreexpresión del gen *metF* a partir del promotor artificial integrado al locus *metF* en el cromosoma, la cepa MG1655 *metA*11 ΔmetJPtrc36-metF::Km*, se ha descrito en la solicitud de patente WO 2007/077041.

El constructo del promotor *Ptrc36-metF::Km* se transdujo a la cepa 6 (Tabla 1) con un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 *metA*11 ΔmetJPtrc36-metF::Km* de acuerdo con el Protocolo 2.

- 10 Se seleccionaron los transductores resistentes a kanamicina y se verificó la presencia del constructo del promotor *Ptrc36-metF::Km* por PCR con los cebadores Ome0726-PtrcmetF-F (SEC ID N°29) y Ome0727-PtrcmetF-R (SEC ID N°30) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP 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 ΔtreBC::TT02-serA-serC::Gt Ptrc36-metF::Km* se denominó cepa 7.

- 15 II. Ejemplo 2: Construcción de la cepa 9, MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC::Gt Ptrc01-pntAB::Cm ΔudhA::Km*

- 20 II.1. Construcción de la cepa 8

II.1.1. Construcción de MG1655 *metA*11 ΔmetJPtrc36-metF* por eliminación del cassette de resistencia a kanamicina

- 25 La resistencia a la kanamicina de la cepa MG1655 *metA*11 ΔmetJPtrc36-metF::Km*, descrita en la solicitud de patente WO2007/077041, se eliminó de acuerdo con el Protocolo 1. La pérdida del cassette resistente a kanamicina se verificó por PCR usando los cebadores Ome0726-PtrcmetF-F (SEC ID N°29) y Ome0727-PtrcmetF-R (SEC ID N°30) (Tabla 2). La cepa resultante se denominó MG1655 *metA*11 ΔmetJPtrc36-metF*.

II.1.2. Construcción de MG1655 *metA*11 ΔmetJPtrc36-metF ΔudhA::Km pKD46*

- 30 Para eliminar el gen *udhA* en la cepa MG1655 *metA*11 ΔmetJPtrc36-metF*, se utilizó el Protocolo 1, excepto que se usaron los cebadores Ome0032-DUdhAF (SEC ID N°31) y Ome0034-DUdhAR (SEC ID N°32) para ampliar el cassette de resistencia a la kanamicina del plásmido pKD4.

Se seleccionaron los recombinantes resistentes a kanamicina. La inserción del cassette de resistencia se verificó por PCR con los cebadores Oag0055-udhAF2 (SEC ID N°33) y Oag0056-udhAR2 (SEC ID N°34) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa resultante se denominó MG1655 *metA*11 ΔmetJPtrc36-metF ΔudhA::Km pKD46*.

Ome0032-DUdhAF (SEC ID N°31)

GGTGCGCGCGTCGCAGTTATCGAGCGTTATCAAAATGTTGGCGGCGGTTGCAC

- 35 CCACTGGGGCACCATCCCGTCGAAAGCCATATGAATATCCTCCTTAG

con:

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *udhA* (4158729-4158650, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)
- secuencia en letra mayúscula subrayada correspondiente al sitio del cebador 1 del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

Ome0034-DUdhAR (SEC ID N°32)

CCCAGAATCTCTTTTGTTCCTCCGATGGAACAAAATTTTCAGCGTGCCACGTTTC

ATGCCGACGATTTGTGCGCGTGCCAGTGCTAGGCTGGAGCTGCTTCC

con

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 3' del gen *udhA* (4157588-4157667, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)
- secuencia en letra mayúscula subrayada correspondiente al sitio del cebador 2 del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

5 II.1.3. Co-transducción de *Ptrc36-metF ΔudhA::Km* a la cepa 6

Los genes *udhA* y *metF* están cercanos en el cromosoma de *E. coli*, 89,61 min y 89,03 min respectivamente y, dado que el fago P1 puede empaquetar 2 min del cromosoma de *E. coli*, los genes *udhA* y *metF* son co-transducibles. En consecuencia, la modificación del promotor *Ptrc36-metF* y la eliminación de *ΔudhA::Km* anteriormente descrito, se co-transdujeron a la cepa 6 (Tabla 1) usando un lisado del fago PI de la cepa MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc36-metF ΔudhA::Km* pKD46, anteriormente descrito, de acuerdo con el Protocolo 2.

Se seleccionaron los transductores resistentes a la kanamicina. La presencia de la modificación del promotor *Ptrc36-metF* se verificó por PCR con los cebadores Ome0726-PtrcmetF-F (SEC ID N°29) y Ome0727-PtrcmetF-R (SEC ID N°30) seguida de secuenciación de ADN. La presencia de la eliminación de *DudhA::Km* se verificó por PCR con los cebadores Oag0055-udhAF2 (SEC ID N°33) y Oag0056-udhAR2 (SEC ID N°34) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC::Gt ΔudhA::Km* se denominó cepa 8.

20 II.2. Construcción de la cepa 9

II.2.1. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 *Ptrc01-pntAB::Cm*

Para aumentar el nivel de expresión de piridina nucleótido transhidrogenasa y subunidades alfa y beta, *PntA* y *PntB*, un promotor *trc01* constitutivo artificial se añadió en dirección 5' del operón *pntAB* a la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 de conformidad con el Protocolo 1, excepto que se usaron los cebadores Ome1149-Ptrc-pntAF (SEC ID N°35) y Ome 1150-Ptrc-pntAR (SEC ID N°36) para ampliar el cassette de resistencia a cloranfenicol del plásmido pKD3. Se seleccionaron los recombinantes resistentes a cloranfenicol. La presencia del promotor artificial *Ptrc01* y la inserción del cassette de resistencia se verificaron por PCR con los cebadores Ome1151-pntAF (SEC ID N°37) y Ome1152-pntAR (SEC ID N°38) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa resultante se denominó MG1655 *metA*11* pKD46 *Ptrc01-pntAB::Cm*.

30 Ome 1149-Ptrc-pntAF (SEC ID N°35)

GCTCGTACATGAGCAGCTTGTGTGGCTCCTGACACAGGCAAACCATCAT
CAATAAAACCGATTACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCCATATGA
ATATCCTCCTTAG

con

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *pntA* (1676002-1675941, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

35 • secuencia en letra mayúscula subrayada para la secuencia del terminador de transcripción T7Te del fago T7 (Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci EE. UU.. 2001 Abr 24;98(9):5019-24.),

- secuencia en letra mayúscula en cursiva correspondiente al sitio del cebador 1 del plásmido pKD3 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

Ome 1150-Ptrc-pntAR (SEC ID N°36)

GCTGCAACACGGGTTTCATTGGTTAACCGTTCTCTTGGTATGCCAATTCG
CATGATATTCCCTTCCTTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAAATTGTCAAC
AGCTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

40 AGCTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

con

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *pntA* (1675875-1675940, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

- secuencia en letra mayúscula subrayada para la secuencia del promotor *trc*
- Secuencia en letra mayúscula en cursiva correspondiente al sitio del cebador 2 del plásmido pKD3 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

II.2.2. Transducción de *Ptrc01-pntAB::Cm* a la cepa 8

- 5 La modificación del promotor *Ptrc01-pntAB::Cm* se transdujo a la cepa 8 (Tabla 1) de acuerdo con el Protocolo 2 usando un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 *Ptrc01-pntAB::Cm* anteriormente descrita.

Se seleccionaron los transductores resistentes a cloranfenicol y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de *Ptrc01-pntAB::Cm* por PCR con Ome1151-pntAF (SEC ID N°37) y Ome1152-pntAR (SEC ID N°38) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 *metA*11* *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* Δ *pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *treBC::TT02-serA-serC::Gt* *Ptrc01-pntAB::Cm* Δ *udhA::Km* se denominó cepa 9.

- 15 III. Ejemplo 3 (comparativo): Construcción de la cepa 10, MG1655 *metA*11* *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* Δ *pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *treBC::TT02-serA-serC*

- 20 III.1. Construcción del plásmido *pUC18- Δ wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm*

El plásmido *pUC18- Δ wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* deriva del plásmido *pCL1920-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* anteriormente descrito y del plásmido *pUC18- Δ wcaM::TT02-MCS::Cm* descrito a continuación.

- 25 III.1.1. Construcción del plásmido *pUC18- Δ wcaM::TT02-MCS::Cm*

Para construir el fragmento *DwcaM::TT02-MCS::Cm*, se efectuó PCR de superposición entre la región en dirección 5' de *wcaM* (*upwcaM*), el terminador de transcripción *TT02*, el sitio de clonación múltiple (MCS) y la región en dirección 3' de *wcaM* (*downwcaM*) y se amplió el cassette de cloranfenicol (*Cm*) y posteriormente se clonó.

- 30 Primero, el fragmento *upwcaM-TT02* se amplió a partir de ADN genómico de *E. coli* MG1655 usando los cebadores Ome 1703-DwcaM-HpaI-EcoRI-F (SEC ID N°39) y Ome 1704-DwcaM-TT02-BstZ17I-R (SEC ID N°40) por PCR. Luego, se amplió el fragmento *TT02-MCS-downwcaM* de ADN genómico de *E. coli* MG1655 usando los cebadores Ome 1705-DwcaM-MCS-BstZ17I-F (SEC ID N°41) y Ome 1706-DwcaM-EcoRI-R (SEC ID N°42) por PCR. Los cebadores Ome 1704-DwcaM-TT02-BstZ17I-R (SEC ID N°40) y Ome 1705-DwcaM-MCS-BstZ17I-F (SEC ID N°41) se diseñaron para superponer una región de 36 nucleótidos de longitud. Finalmente, el fragmento *upwcaM-TT02-MCS-downwcaM* se amplió mezclando los amplicones *upwcaM-TT02* y *TT02-MCS-downwcaM* y usando los
- 35 cebadores Ome 1703-DwcaM-HpaI-EcoRI-F (SEC ID N°39) y Ome 1706-DwcaM-EcoRI-R (SEC ID N°42). El producto de la fusión de PCR resultante se digirió por HpaI y se clonó entre los sitios *HindIII* y *EcoRI* del plásmido *pUC18* que se había tratado mediante Large (Klenow) Fragmento de *E. coli* ADN Polimerasa I. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se llamó *pUC18- Δ wcaM::TT02-MCS*.

- 40 Ome 1703-DwcaM-HpaI-EcoRI-F (SEC ID N°39)

CGTAGTTAACGAATTCCTGCGCCACCGAGCCAGCCAGACCTTGCGC

con

- secuencia en letra mayúscula subrayada para los sitios de restricción *HpaI* y *EcoRI* y extrabases,
- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 3' del gen *wcaM* (2114909-2114938, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

- 45

Ome 1704-DwcaM-TT02-BstZ17I-R (SEC ID N°40)

GCTTGATACAAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTTCGACTGAGCCTTTTCG

TTTTATTTGATGGCGTTCTCTCTATAAAGCCTGCAGCAAGC

con

- secuencia en letra mayúscula negrita para el sitio de restricción *Bst*Z17I y extrabases,
- secuencia en letra mayúscula subrayada correspondiente al terminador de transcripción T₁ de *E. coli rrmB* (Orosz A, Boros I y Venetianer P. Eur. J. Biochem. 1991 Nov 1;201(3):653-9)

- 5 • secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 3' del gen *wcaM* (2113921-2113950, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>).

Ome 1705 (DwcaM-MCS-BstZ17I-F) (SEC ID N°41)

AGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTATACAAGCTTAATTAAGGGCCCCGG
GCGGATCCATTTGCGACCATTCTGGAAAAATGGAGTC

con

- 10 • secuencia en letra mayúscula en negrita complementaria a la secuencia del extremo 3' del terminador de transcripción T₁ de *E. coli rrmB* (Orosz A, Boros I y Venetianer P. Eur. J. Biochem. 1991 Nov 1;201(3):653-9),
- secuencia en letra mayúscula subrayada que contiene un sitio de clonación múltiple: *Bst*Z17I, *Hind*III, *Pac*I, *Ap*aI, *Bam*HI,
- 15 • secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *wcaM* (2112496-2112525, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Ome 1706 (DwcaM-EcoRI-R) (SEC ID N°42)

CGTAGTTAACGAATTCGCCCTTCTTTCAGGTTGCGTAGGCCATAC

con

- secuencia en letra mayúscula en negrita para los sitios de restricción *Hpa*I y *Eco*RI y extrabases,
- 20 • secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *wcaM* (2111497-2111527, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Finalmente, los cebadores Ome 1603- K7_Cm_ampl_SmaI_BstZ17I_F (SEC ID N°9) y Ome 1604- K7_Cm_ampl_HindIII_R (SEC ID N°10), descritos anteriormente, se usaron para ampliar el cassette de cloranfenicol del plásmido pKD3. El cassette se clonó luego entre los sitios *Bst*Z17I y *Hind*III del plásmido pUC18- Δ *wcaM*::*TT02*-MCS. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pUC18- Δ *wcaM*::*TT02*-MCS-Cm.

- 25

III.1.2. Construcción del plásmido pUC18- Δ *wcaM*::*TT02*-*TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm

Para construir pUC18- Δ *wcaM*::*TT02*-*TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm, *TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11 *Ap*aI/*Bam*HI se clonó el fragmento digerido de pCL1920-*TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11 anteriormente descrito entre los sitios *Ap*aI y *Bam*HI de pUC18- Δ *wcaM*::*TT02*-MCS-Cm anteriormente descritos. El plásmido obtenido se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pUC18- Δ *wcaM*::*TT02*-*TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm

- 30

III.2. Construcción de la cepa MG1655 *metA**11 Δ *wcaM*::*TT02*-*TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm pKD46

- 35 Para reemplazar el gen *wcaM* por la región, *TT02*-*TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm, se digirió el plásmido pUC18- Δ *wcaM*::*TT02*-*TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm por *Bsp*HI y el fragmento digerido remanente Δ *wcaM*::*TT02*-*TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm se introdujo en la cepa MG1655 *metA**11 pKD46 de acuerdo con el Protocolo 1.

- 40 Se seleccionaron los recombinantes resistentes a cloranfenicol y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de Δ *wcaM*::*TT02*-*TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm por PCR con los cebadores Ome1707-DwcaM_verif_F (SEC ID N°43) y Ome1708-DwcaM_verif_R (SEC ID N°44) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA**11 Δ *wcaM*::*TT02*-*TTadc*-*PlambdaR**(-35)-*RBS01*-*thrA**1-*cysE*-*PgapA*-*metA**11::Cm (pKD46)

III.3. Transducción de *DwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* a la cepa 6 y eliminación del cassette de resistencia.

La modificación cromosómica de *ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* se transdujo a la cepa 6 (Tabla 1) anteriormente descrita con un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 *ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* anteriormente descrita, de acuerdo con el Protocolo 2.

Se seleccionaron los transductores resistentes al cloranfenicol y se verificó la modificación cromosómica de *ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm* por PCR con Ome1707-DwcaM_verif_F (SEC ID N°43) y Ome1708-DwcaM_verif_R (SEC ID N°44) (Tabla 2). La cepa resultante se denominó MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC::Gt ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11::Cm*.

Los cassettes de gentamicina y cloranfenicol de la cepa anterior se eliminaron luego de acuerdo con el Protocolo 1. La pérdida de los cassettes de gentamicina y cloranfenicol se verificó por PCR usando los cebadores Ome 1595-DtreB_verif_F (SEC ID N°27) and Ome 1596-DtreB_verif_R (SEC ID N°28) y los Ome1707-DwcaM_verif_F (SEC ID N°43) and Ome1708-DwcaM_verif_R (SEC ID N°44) (Tabla 2) respectivamente. La cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC* se denominó cepa 10.

IV. Ejemplo 4 : Construcción de la cepa 12, MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 DtreBC::TT02-serA-serC* *Ptrc01-pntAB::Cm* pCL1920-PgapA-pycRe-TT07

IV.1. Construcción de la cepa 11 por transducción de *Ptrc01-pntAB::Cm* a la cepa 10

La modificación del promotor *Ptrc01-pntAB::Cm* anteriormente descrito se transdujo a la cepa 10 (Tabla 1) de conformidad con el Protocolo 2, usando un lisado del fago PI de la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 *Ptrc01-pntAB::Cm* anteriormente descrita.

Se seleccionaron los transductores resistentes a cloranfenicol y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de *Ptrc01-pntAB::Cm* por PCR con los cebadores Ome1151-pntAF (SEC ID N°37) y Ome1152-pntAR (SEC ID N°38) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC* *Ptrc01-pntAB::Cm* se denominó cepa 11.

IV.2. Construcción de pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 e introducción a la cepa 11

Con el fin de sobreexpresar el gen de piruvato carboxilasa de *Rhizobium etli*, se construyó el plásmido pCL1920-PgapA-pycRe-TT07, que derivó del plásmido pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15 pág. 4631).

Para construir el inserto *PgapA-pycRe-TT07*, se empleó PCR de superposición entre el promotor *gapA*, su sitio de unión al ribosoma (RBS) y el gen *pycRe* de *Rhizobium etli*.

Primero, el promotor *gapA* y la región RBS (correspondiente a la región en dirección 5' -156 a -1 del codón de inicio de *gapA*) se amplió a partir de ADN genómico de *E. coli* MG1655 por PCR usando los cebadores *PgapA-Sall-F* (SEC ID N°45) y *PgapA-pycRe-R* (SEC ID N°46). Después, el gen *pycRe* se amplió a partir de ADN genómico de *Rhizobium etli* CFN 42 usando los cebadores *PgapA-pycRe F* (SEC ID N°47) y *pycRe-TT07-Smal-R* (SEC ID N°48). Los cebadores *PgapA-pycRe-R* (SEC ID N°46) y *PgapA-pycRe F* (SEC ID N°47) se diseñaron para superponer una región de 42 nucleótidos de longitud. Finalmente, se amplió el fragmento *PgapA-RBSgapA-pycRe-TT07* mezclando el promotor *gapA*-RBS y los amplicones *pycRe* usando los cebadores *PgapA-Sall-F* (SEC ID N°45) y *pycRe-TT07-*

Smal-R (SEC ID N°48). El producto resultante de la fusión PCR se clonó entre los sitios *Sall* y *Smal* del plásmido pCL1920. El plásmido resultante se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pCL1920-PgapA-pycRe-TT07.

PgapA-Sall-F (SEC ID N°45)

ACGCGTCGACGGTATCGATAAGCTTCGTTTAAACAAGCCCAAAGGAAGAGTG

A

- 5
- secuencia en letra mayúscula subrayada para los sitios de restricción *Sall*, *Clal*, *HindIII* y *PmeI* y extrabases,
 - secuencia en letra mayúscula en negrita homóloga a la secuencia del promotor *gapA* (1860640-1860658, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

PgapA-pycRe-R (SEC ID N°46)

10 GTATCTTGGATATGGGCAT**ATGTTCCACCAGCTATTTGTTAG**

con

- secuencia en letra mayúscula en negrita homóloga al promotor del gen *gapA* (1860772-1860791, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)
 - secuencia en letra mayúscula homóloga al gen *pycRe*, excepto que el codón de inicio GTG del gen *pycRe* se reemplazó con ATG (4236889-4236906, secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- 15

PgapA-pycRe F (SEC ID N°47)

CTAACAAATAGCTGGTGGAACATATGCCCATATCCAAGATAC

con

- 20
- secuencia en letra mayúscula en negrita homóloga al promotor del gen *gapA* (1860772-1860791, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)
 - secuencia en letra mayúscula homóloga al gen *pycRe*, excepto que el codón de inicio GTG del gen *pycRe* se reemplazó con ATG (4236889-4236906, secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

pycRe-TT07-Smal-R (SEC ID N°48)

TCCCCCGGGGATCCGAATTCGCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAGCTC

GAGGGCAAGGACGGGCGAACGAAACCTTTCGTGCCGTTTCGCTCATCCGCC

GTAACCGCCAG

25 con

- secuencia en letra mayúscula subrayada para los sitios de restricción *Smal*, *BamHI* y *EcoRI* y extrabases,
 - secuencia en letra mayúscula correspondiente a la secuencia del terminador de transcripción T7Te del fago T7 (Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2001 Abr 24;98(9):5019-24.),
 - secuencia en letra mayúscula cursiva para el sitio de restricción *XhoI* y extrabases,
- 30
- secuencia en letra mayúscula en negrita homóloga a la secuencia en dirección 3' del gen *pycRe* (4240332-4240388, secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Luego, se introdujo pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 por electroporación en la cepa 11 (Tabla 1). Se verificó la presencia del plásmido pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 y la cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC Ptrc01-pntAB::Cm* pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 se denominó cepa 12.

35

V. Ejemplo 5 : Construcción de la cepa 13, MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::*TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* Δ *pgaABCD*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *uxaCA* ::*TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *CP4-6*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *wcaM*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *treBC*::*TT02-serA-serC* *Ptrc01-pntAB* ::*Cm* *AudhA*::*Km*

La eliminación de *AudhA*::*Km* descrita previamente se transdujo a la cepa 11 (Tabla 1) usando un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 *metA**11 Δ *metJ* *Ptrc36-metF* *AudhA*::*Km* pKD46 anteriormente descrita de conformidad con el Protocolo 2

Se seleccionaron los transductores resistentes a la kanamicina. Se verificó la presencia de la modificación del promotor *Ptrc36-ARNmst17-metF* por PCR con los cebadores Ome0726-*PtrcmetF*-F (SEC ID N°29) y Ome0727-*PtrcmetF*-R (SEC ID N°30) seguida de secuenciación de ADN, y la presencia de la eliminación de *AudhA*::*Km* se verificó por PCR con los cebadores Oag0055-*udhAF2* (SEC ID N°33) y Oag0056-*udhAR2* (SEC ID N°34) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::*TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* Δ *pgaABCD*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *uxaCA* ::*TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *CP4-6*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *wcaM*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *treBC*::*TT02-serA-serC* *Ptrc01-pntAB*::*Cm* *AudhA*::*Km* se denominó cepa 13.

VI. Ejemplo 6 : Construcción de la cepa 14 MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::*TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* Δ *pgaABCD*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *uxaCA* ::*TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *CP4-6*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *wcaM*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *treBC* ::*TT02-serA-serC* *Ptrc01-pntAB* ::*Cm* *AudhA* ::*Km*

Los genes *udhA* y *metF* están próximos en el cromosoma de *E. coli*, 89,61 min y 89,03 min respectivamente y, dado que el fago P1 puede empaquetar 2 min del cromosoma de *E. coli*, los genes *udhA* y *metF* son co-transducibles. En consecuencia, la modificación del promotor *Ptrc36-metF* y la eliminación de *AudhA*::*Km* anteriormente descrita, se co-transdujeron a la cepa 11 (Tabla 1) usando un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 *metA**11 Δ *metJ* *Ptrc36-metF* *AudhA*::*Km* pKD46, anteriormente descrita, de conformidad con el Protocolo 2.

Se seleccionaron los transductores resistentes a la kanamicina. La presencia de la modificación del promotor *Ptrc36-metF* se verificó por PCR con los cebadores Ome0726-*PtrcmetF*-F (SEC ID N°29) y Ome0727-*PtrcmetF*-R (SEC ID N°30) seguida de secuenciación de ADN. La presencia de la eliminación de *AudhA*::*Km* se verificó por PCR con los cebadores Oag0055-*udhAF2* (SEC ID N°33) y Oag0056-*udhAR2* (SEC ID N°34) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::*TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* Δ *pgaABCD*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *uxaCA* ::*TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *CP4-6*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *wcaM*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *treBC*::*TT02-serA-serC* *Ptrc01-pntAB*::*Cm* *AudhA*::*Km* se denominó cepa 14.

VII. Ejemplo 7 : Construcción de la cepa 15, MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::*TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* Δ *pgaABCD*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *uxaCA*::*TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *CP4-6*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *wcaM*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *treBC* ::*TT02-serA-serC* *Ptrc01-pntAB*::*Cm* *AudhA*::*Km* pCL1920-*PgapA-pycRe*-TT07

pCL1920-*PgapA-pycRe*-TT07, previamente descrito se introdujo por electroporación en la cepa 13 (Tabla 1). Se verificó la presencia del plásmido pCL1920-*PgapA-pycRe*-TT07 y la cepa resultante MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::*TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* Δ *pgaABCD*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *uxaCA* ::*TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *CP4-6*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *wcaM*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *treBC* ::*TT02-serA-serC* *Ptrc01-pntAB*::*Cm* *AudhA*::*Km* pCL1920-*PgapA-pycRe*-TT07 se denominó cepa 15.

VIII. Ejemplo 8 : Construcción de la cepa 18, MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::*TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE* Δ *pgaABCD*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *uxaCA*::*TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* Δ *CP4-6*::*TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11*

cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 DtreBC ::TT02-serA-serC Ptrc30-pntAB::Cm ΔudhA pCL1920-PgapA-pycRe-TT07

VIII.1. Construcción de la cepa 16 por eliminación de los cassettes de resistencia de la cepa 13

Los cassettes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol de la cepa 13, anteriormente descrita, se eliminaron de acuerdo con el Protocolo 1. La pérdida de los cassettes resistentes a kanamicina y cloranfenicol se verificaron por PCR usando los cebadores Oag0055-udhAF2 (SEC ID N°33), Oag0056-udhAR2 (SEC ID N°34), Ome1151-pntAF (SEC ID N°37) y Ome1152-pntAR (SEC ID N°38) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 DtreBC ::TT02-serA-serC Ptrc01-pntAB ΔudhA pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 se denominó cepa 16.*

VIII.2. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 *Ptrc30-pntAB::Cm*

Para aumentar el nivel de expresión de las subunidades alfa y beta de piridina nucleótido transhidrogenasa, *PntA* y *PntB*, se añadió un promotor artificial constitutivo de *trc30* en dirección 5' del operón *pntA-pntB* a la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 de acuerdo con el Protocolo 1, excepto que se usaron los cebadores Ome2104 *Ptrc30-pntAR* (SEC ID N°49) y Ome 1150-*Ptrc-pntAF* (SEC ID N°36) para ampliar el cassette de resistencia a cloranfenicol del plásmido pKD3.

Se seleccionaron los recombinantes resistentes a cloranfenicol. La presencia del promotor artificial *trc30* y la inserción del cassette de resistencia se verificaron por PCR con los cebadores Ome1151-pntAF (SEC ID N°37) y Ome1152-pntAR (SEC ID N°38) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA*11 pKD46 Ptr30-pntAB::Cm*.

Ome2104 *Ptrc30-pntA* R (SEC ID N°49)

GCTGCAACACGGGTTTCATTGGTTAACCGTTCTCTTGGTATGCCAATTCGCATG
ATATTCCCTTCCTTCCACACAGTATACGAGCCGGATGATTAATCGTCAACAGCT
CTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

con

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *pntA* (1675875-1675940, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)
- secuencia en letra mayúscula subrayada para la secuencia del promotor *trc30*
- secuencia en letra mayúscula en cursiva correspondiente al sitio del cebador 2 del plásmido pKD3 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

VIII.3. Construcción de la cepa 17 por transducción de *Ptrc30-pntAB::Cm* a la cepa 16

La modificación del promotor *Ptrc30-pntAB::Cm* se transdujo a la cepa 16 (Tabla 1) usando un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 *Ptrc30-pntAB::Cm* anteriormente descrita de conformidad con el Protocolo 2.

Se seleccionaron los transductores resistentes al cloranfenicol y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de *Ptrc30-pntAB::Cm* se verificó por PCR con Ome1151-pntAF (SEC ID N°37) y Ome1152-pntAR (SEC ID N°38) (Tabla 2). La cepa verificada y seleccionada MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 DtreBC::TT02-serA-serC *Ptrc30-pntAB::Cm* ΔudhA se denominó cepa 17.*

VIII.4. Construcción de la cepa 18 por introducción de pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 a la cepa 17

pCL1920-PgapA-pycRe-TT07, descrito anteriormente, se introdujo por electroporación en la cepa 17 (Tabla 1). Se verificó la presencia del plásmido pCL1920-PgapA-pycRe-TT07, y la cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC ::TT02-serA-serC Ptrc30-pntAB::Cm ΔudhA pCL1920-PgapA-pycRe-TT07* se denominó 18.

IX. Ejemplo 9 : Construcción de la cepa 20, MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC ::TT02-serA-serC Ptrc97-pntAB::Cm ΔudhA pCL1920-PgapA-pycRe-TT07*

IX.1. Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 pKD46 Ptrc97-pntAB::Cm*

Para aumentar el nivel de expresión de las subunidades alfa y beta de piridina nucleótido transhidrogenasa, PntA y PntB, se añadió un promotor constitutivo artificial de *trc97* en dirección 5' del operón *pntA-pntB* a la cepa MG1655 *metA*11 pKD46* de acuerdo con el Protocolo 1, excepto que se usaron los cebadores Ome2105 *Ptrc97-pntAR* (SEC ID N°50) y Ome 1150-*Ptrc-pntAF* (SEC ID N°36) para ampliar el cassette de resistencia al cloranfenicol del plásmido pKD3.

Se seleccionaron los recombinantes resistentes al cloranfenicol. La presencia del promotor artificial *trc97* y la inserción del cassette de resistencia se verificaron por PCR con los cebadores Ome1151-*pntAF* (SEC ID N°37) y Ome1152-*pntAR* (SEC ID N°38) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA*11 pKD46 Ptr97-pntAB::Cm*.

Ome 2105 *Ptrc97-pntAR* (SEC ID N°50)

GCTGCAACACGGGTTTCATTGGTTAACCGTTCTCTTGGTATGCCAATTCGCATG
ATATTCCTTCCTTCCACACATTTTACGAGCCGGATGATTAATAGCCAACAGCT
CTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

con

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *pntA* (1675875-1675940, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

- secuencia en letra mayúscula subrayada para la secuencia del promotor *trc97*

- Secuencia en letra mayúscula en cursiva correspondiente al sitio del cebador 2 del plásmido pKD3 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

IX.2. Construcción de la cepa 19 por transducción de *Ptrc97 pntAB::Cm* a la cepa 16

La modificación del promotor *Ptrc97-pntAB::Cm* se transdujo a la cepa 16 (Tabla 1) usando un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 *metA*11 pKD46 Ptrc97-pntAB::Cm* anteriormente descrita de acuerdo con el Protocolo 2.

Se seleccionaron los transductores resistentes al cloranfenicol y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de *Ptrc97-pntAB::Cm* por PCR con Ome1151-*pntAF* (SEC ID N°37) y Ome1152-*pntAR* (SEC ID N°38) (Tabla 2). La cepa verificada y seleccionada MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC::Gt Ptrc97-pntAB::Cm ΔudhA* se denominó cepa 19.

IX.3. Construcción de la cepa 20 por introducción de pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 en la cepa 19

pCL1920-PgapA-pycRe-TT07, previamente descrito, se introdujo por electroporación en la cepa 19 (Tabla 1). Se verificó la presencia del plásmido pCL1920-PgapA-pycRe-TT07, y la cepa resultante MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC Ptrc97-pntAB::Cm ΔudhA pCL1920-PgapA-pycRe-TT07* se denominó cepa 20.

X. Ejemplo 10 : Construcción de la cepa 22, MG1655 *metA**11 *P*trc-metH *P*trcF-cysPUWAM *P*trcF-cysJIH *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-metF *P*trc07-serB Δ metJ Δ pykF Δ pykA Δ purU Δ yncA Δ malS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE Δ pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 *D*treBC ::TT02-serA-serC *P*trc55-pntAB::Cm Δ udhA pCL1920-PgapA-pycRe-TT07

X.1. Construcción de la cepa MG1655 *metA**11 pKD46 *P*trc55 pntAB::Cm

Para aumentar el nivel de expresión de las subunidades alfa y beta de piridina nucleótido transhidrogenasa, *P*ntA y *P*ntB, se añadió un promotor artificial constitutivo de *trc55* en dirección 5' del operón *pntA-pntB* en la cepa MG1655 *metA**11 pKD46 de conformidad con el Protocolo 1, excepto que se usaron los cebadores Oag 0699-*P*trc55-pntAB R (SEC ID N°51) y Ome 1150-*P*trc-pntAF (SEC ID N°36) para ampliar el cassette de resistencia a cloranfenicol del plásmido pKD3.

Se seleccionaron los recombinantes resistentes al cloranfenicol. Se verificaron la presencia del promotor artificial *trc55* y la inserción del cassette de resistencia por PCR con los cebadores Ome1151-pntAF (SEC ID N°37) y Ome1152-pntAR (SEC ID N°38) (Tabla 2) y por secuenciación de ADN. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA**11 pKD46 *P*trc55-pntAB::Cm.

Oag 0699-*P*trc55-pntAB R (SEC ID N°51)

GCTGCAACACGGGTTTCATTGGTTAACCGTTCTCTTGGTATGCCAATTCGCATG
ATATTCCTTCCCTTCCACACACTATACGAGCCGGATGATTAATGGTCAACAGCT
CTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

con

- secuencia en letra mayúscula homóloga a la secuencia en dirección 5' del gen *pntA* (1675875-1675940, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

- secuencia en letra mayúscula subrayada para la secuencia del promotor *trc55*

- secuencia en letra mayúscula cursiva correspondiente al sitio del cebador 2 del plásmido pKD3 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

X.2. Transducción de *P*trc55 pntAB::Cm a la cepa 16

La modificación del promotor *P*trc55-pntAB::Cm se transdujo a la cepa 16 (Tabla 1) usando un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 *metA**11 pKD46 *P*trc55-pntAB::Cm anteriormente descrita de conformidad con el Protocolo 2.

Se seleccionaron los transductores resistentes al cloranfenicol y se verificó la presencia de la modificación cromosómica de *P*trc55-pntAB::Cm por PCR con Ome1151-pntAF (SEC ID N°37) y Ome1152-pntAR (SEC ID N°38) (Tabla 2). La cepa verificada y seleccionada MG1655 *metA**11 *P*trc-metH *P*trcF-cysPUWAM *P*trcF-cysJIH *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-metF *P*trc07-serB Δ metJ Δ pykF Δ pykA Δ purU Δ yncA Δ malS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE Δ pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ treBC::TT02-serA-serC::Gt *P*trc55-pntAB::Cm Δ udhA se denominó cepa 21.

X.3. Construcción de la cepa 22 por introducción de pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 en la cepa 21

pCL1920-PgapA-pycRe-TT07, previamente descrito, se introdujo por electroporación en la cepa 21 (Tabla 1). Se verificó la presencia del plásmido pCL1920-PgapA-pycRe-TT07, y la cepa resultante MG1655 *metA**11 *P*trc-metHPtrcF-cysPUWAM *P*trcF-cysJIH *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-metF *P*trc07-serB Δ metJ Δ pykF Δ pykA Δ purU Δ yncA Δ malS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE Δ pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ treBC::TT02-serA-serC *P*trc55-pntAB::Cm Δ udhA pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 se denominó cepa 22.

XI. Ejemplo 11 : Construcción de la cepa 24, MG1655 *metA**11 *P*trc-metH *P*trcF-cysPUWAM *P*trcF-cysJIH *P*trc09-gcvTHP *P*trc36-ARNmst17-metF *P*trc07-serB Δ metJ Δ pykF Δ pykA Δ purU Δ yncA Δ malS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE Δ pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 Δ CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-

cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 DtreBC::TT02-serA-serC ΔudhA::Km pCL1920-PgapA-pycRe-TT07

XI.1. Construcción de la cepa 23 por transducción de ΔudhA::Km a la cepa 10

5 La eliminación de ΔudhA::Km anteriormente descrita se transdujo a la cepa 10 (Tabla 1) usando un lisado del fago P1 de la cepa MG1655 metA*11 ΔmetJ Ptrc36-metF ΔudhA::Km pKD46 anteriormente descrita de conformidad con el Protocolo 2.

10 Se seleccionaron los transductores resistentes a kanamicina. Se verificó la presencia de la modificación del promotor Ptrc36-ARNmst17-metF por PCR (los motivos se explican en el ejemplo 6) con los cebadores Ome0726-PtrcmetF-F (SEC ID N°29) y Ome0727-PtrcmetF-R (SEC ID N°30) seguida de secuenciación de ADN, y se verificó la presencia de la eliminación de ΔudhA::Km por PCR con los cebadores Oag0055-udhAF2 (SEC ID N°33) y Oag0056-udhAR2 (SEC ID N°34) (Tabla 2). La cepa resultante MG1655 metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC ΔudhA::Km se denominó cepa 23.

XI.2. Construcción de la cepa 24: introducción de pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 a la cepa 23

20 pCL1920-PgapA-pycRe-TT07, previamente descrito, se introdujo por electroporación en la cepa 23 (Tabla 1). Se verificó la presencia del plásmido pCL1920-PgapA-pycRe-TT07, y la cepa resultante MG1655 metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-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 ΔtreBC::TT02-serA-serC ΔudhA::Km pCL1920-PgapA-pycRe-TT07 se denominó cepa 24.

25 XII. Ejemplo 12: Producción de L-metionina por fermentación en matraces de agitación

30 La producción de cepas se evaluó en matraces Erlenmeyer pequeños. Se desarrolló un precultivo de 5,5 ml a 30°C durante 21 horas en un medio mixto (10% medio LB (Caldo LB Miller 25 g/l) con 2,5 g.l⁻¹ glucosa y 90% medio mínimo PC1). Se usó para inocular un cultivo de 50 ml de medio PC1 hasta un valor OD₆₀₀ de 0,2. Si fue necesario, se añadieron antibióticos en concentraciones de 50 mg.l⁻¹ para kanamicina y espectinomicina, 30 mg.l⁻¹ para cloranfenicol y 10 mg.l⁻¹ para gentamicina. La temperatura del cultivo se mantuvo a 37°C durante dos horas, 42°C durante dos horas y luego 37°C hasta el final del cultivo. Cuando el cultivo había alcanzado un valor OD₆₀₀ de 5 a 7, se cuantificaron los aminoácidos extracelulares por HPLC. Después de la derivación de OPA/Fmoc se analizaron otros metabolitos relevantes usando HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa) y GC-MS después de la siilación. Para cada cepa, se efectuaron varias repeticiones.

35 Tabla 3: Composición en 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

Compuesto	Concentración (g.l ⁻¹)
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 a pH 6,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,04
Tiamina	0,01
Glucosa	15,00
Tiosulfato de amonio	5,60
Vitamina B12	0,01
MOPS	15,00

Tabla 4: Rendimiento de metionina (Y_{met}), en % g de metionina por g de glucosa producida en cultivo en lotes por las distintas cepas. Para la definición de rendimiento de metionina/glucosa, ver a continuación. SD indica la desviación estándar para los rendimientos que se calculó en base a varias repeticiones (N = número de repeticiones).

Cepa	Y_{met}	SD
Cepa 7 N = 3 (comparativa)	7,27	0,12
Cepa 9 N = 6	9,94	0,90
Cepa 14 N = 6	10,25	0,51
Cepa 10 N = 110 (comparativa)	9,75	1,29
Cepa 13 N = 9	12,09	0,71
Cepa 15 N = 6	12,88	0,54
Cepa 24 N = 3	11,41	0,18
Cepa 12 N = 3	12,65	0,10

5

La concentración de metionina extracelular se cuantificó por HPLC después de la derivación de OPA/FMOC. La concentración de glucosa residual se analizó usando HPLC con detección refractométrica. El rendimiento de metionina se expresa de la siguiente manera:

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

Como se puede observar en la tabla 4, el rendimiento de metionina/glucosa (Y_{met}) aumenta tras la sobreexpresión de *pntAB* y/o la eliminación de *udhA* (cepas 9 y 14 comparadas con la cepa 7, y cepas 12, 13, 15 y 24 comparadas con la cepa 10).

- 5 La mejora del rendimiento es incluso mejor tras las sobreexpresión fuerte del gen *metF*. La cepa 13 que contiene tanto una secuencia de estabilización de ARNm frente al gen de *metF* y la sobreexpresión de *pntAB* y la eliminación de *udhA* exhibe un rendimiento superior que la cepa 14 sin una sobreexpresión fuerte de la vía C1.

XIII. Ejemplo 13: Actividades de transhidrogenasa y 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa

- 10 Los resultados descritos en el ejemplo 12, tabla 4 se confirmaron por análisis de las actividades de transhidrogenasa y 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa llevados a cabo por PntAB y MetF, respectivamente (Tabla 5). En los cultivos de matraces Erlenmeyer pequeños, ambas actividades aumentan tras la sobreexpresión.

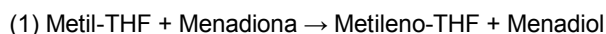
Tabla 5: Las actividades de transhidrogenasa (TH, PntAB) y 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR, MetF) se determinaron en las cepas anteriormente descritas y se exponen en mUI/mg de proteínas (N = número de cultivos de matraces Erlenmeyer independientes).

Cepa	TH	MTHFR
Cepa 7 (N=3) (comparativa)	48 ± 2	8 ± 4
Cepa 9 (N=3)	802 ± 43	15 ± 5
Cepa 14 (N=3)	799 ± 75	5 ± 1
Cepa 10 (N=3) (comparativa)	36 ± 4	69 ± 3
Cepa 13 (N=9)	665 ± 35	94 ± 7
Cepa 15 (N=3)	629 ± 37	75 ± 8
Cepa 24 (N=3) (comparativa)	29 ± 4	ND
Cepa 12 (N=3)	582 ± 27	ND

- 15 Para la determinación *in vitro* de las actividades enzimáticas, se cultivaron cepas de *E. coli* en medio mínimo como se describió anteriormente. En el método de extracción precedente, las células se cosecharon a partir de caldo de cultivo por centrifugación. El sedimento se resuspendió en tampón de fosfato de potasio frío 20 mM (pH 7.2) y las células se lisaron por batido de esferas con un aparato Precellys (Bertin Technologies; 2x10s a 5000rpm, 2 minutos entre las dos etapas) seguido de centrifugación a 12000g (4°C) durante 30 minutos. El sobrenadante se desaló y se usó para análisis. Se determinaron las concentraciones de proteínas usando reactivo de ensayo Bradford.

- 20 Se ensayaron las actividades de la transhidrogenasa (TH) como se describió previamente (Yamagushi y Stout, 2003). La actividad de la transhidrogenasa cíclica se ensayó de manera espectrofotométrica durante 30 minutos a 375nm en una mezcla de reacción a 37°C que contenía MES-KOH 50mM (pH 6,0), NADH 0,2 mM, AcPyAD 0,2 mM con o sin NADPH 10 µM y 6 µg de extracto celular bruto. Todos los resultados son el promedio de por lo menos tres mediciones.

Se ensayaron las actividades de 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR) como se describió previamente (Matthews, 1986) con algunas modificaciones. El método se muestra en la ecuación (1).



- 30 Se usa metil-THF como el sustrato y la formación de metileno-THF se mide por descomposición de ácido de metileno-THF que produce formaldehído. El formaldehído producido reacciona con el NBDH indicador para formar

un derivado de hidrazona fluorescente a 530 nm. Se ensayó la actividad de 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa durante 30 minutos a 37°C en una mezcla de reacción que contenía tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 6,7), EDTA 0,3 mM, 0,2 % (p/v) albúmina de suero bovino, disolución saturada de menadiona en 20% metanol/80% H₂O y 20 µg de extracto celular bruto. Después de la incubación, la reacción finaliza por adición de tampón de acetato de sodio (pH 4,7) y disponiendo el tubo en un bloque calentador a 100°C durante 2 minutos. Después de la centrifugación durante 5 minutos a 10000 g, el formaldehído producido se mide por adición de 0,001% NBDH en 95% etanol/6% ácido fosfórico con una lectora de microplacas de fluorescencia FLx800 (Biotek).

XIV. Ejemplo 14: Producción de L-metionina por fermentación en un biorreactor

Las cepas que produjeron cantidades sustanciales de metabolitos de interés se ensayaron prácticamente bajo las condiciones de producción en fermentadores de 2,5 l (Pierre Guerin) usando una estrategia de lote alimentado (fedbatch).

En síntesis, se usó un cultivo de 24 horas desarrollado en 10 ml de medio LB con 2,5 g.l⁻¹ glucosa para inocular un precultivo de 24 horas en medio mínimo (B1a). Estas incubaciones se llevaron a cabo en matraces muescados de 500 ml que contenían 50 ml de medio mínimo (B1a) en un agitador rotatorio (200 RPM). El primer cultivo se efectuó a una temperatura de 30°C, el segundo a una temperatura de 34°C.

Se llevó a cabo un tercer precultivo en biorreactores (Sixfors) rellenos con 200 ml de medio mínimo (B1b) inoculado hasta una concentración de biomasa de 1,2 g.l⁻¹ con 5 ml de precultivo concentrado. La temperatura del precultivo se mantuvo constante a 34°C y el pH se ajustó automáticamente hasta un valor de 6,8 usando una disolución al 10% de NH₄OH. La concentración de oxígeno disuelto se ajustó continuamente hasta un valor de 30 % de la saturación de aire parcial con suministro de aire y/o agitación. Después del agotamiento de la glucosa del medio del lote, se inició el lote alimentado con un caudal inicial de 0,7 ml.h⁻¹, aumentado en forma exponencial durante 24 horas con un índice de crecimiento de 0,13 h⁻¹ con el fin de obtener una concentración celular final de aproximadamente 18 g.l⁻¹.

Tabla 6: Composición en medio mineral de lotes de precultivo (B1a y B1b).

Compuesto	Concentración de B1a (g.l ⁻¹)	Concentración de B1b (g.l ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	0,0130	0,0130
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,0015	0,0015
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,0150	0,0150
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0025	0,0025
H ₃ BO ₃	0,0030	0,0030
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0025	0,0025
Citrato de Fe(III) H ₂ O	0,1064	0,1064
EDTA	0,0084	0,0084
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,00	1,00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,08	0,08
Ácido cítrico	1,70	1,70
KH ₂ PO ₄	4,57	4,57
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	2,50	2,50
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,10	1,10
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,90	4,90
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	1,00	1,00
Tiamina	0,01	0,01
Vitamina B 12	0,01	0,01
Glucosa	30,00	5,00

ES 2 637 280 T3

Compuesto	Concentración de B1a (g.l ⁻¹)	Concentración de B1b (g.l ⁻¹)
MOPS	30,00	0,00
NH ₄ OH 28%	Ajustada hasta pH 6,8	Ajustada hasta pH 6,8

Tabla 7: Composición del medio mineral del lote alimentado de precultivo (F1)

Compuesto	Concentración (g.l ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	0,0104
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0012
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0120
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0020
H ₃ BO ₃	0,0024
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0020
Citrato de Fe(III) H ₂ O	0,0424
EDTA	0,0067
MgSO ₄	5,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,30
Na ₂ SO ₄	8,90
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	24,80
Tiamina	0,01
Glucosa	500,00
Vitamina B 12	0,01
NH ₄ OH 28%	Ajustada hasta pH 6,8

Tabla 8: Composición del medio mineral del lote de cultivo (B2).

Compuesto	Concentración (g.l ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O	0,0130
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0015
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0150
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
H ₃ BO ₃	0,0030
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0025
Citrato de Fe(III) H ₂ O	0,1064
EDTA	0,0084
MgS ₂ O ₃ .6H ₂ O	1,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,08
Ácido cítrico	1,70

Compuesto	Concentración (g.l ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	2,97
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,65
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,72
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	3,74
Tiamina	0,01
Vitamina B12	0,01
Biotina	0,10
Glucosa	10
NH ₄ OH 28%	Ajustada hasta pH 6,8

Tabla 9: Composición del medio del lote alimentado de cultivo (F2)

Compuesto	Concentración (g.l ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	0,0104
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,0012
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,0120
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0020
H ₃ BO ₃	0,0024
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0020
Citrato de Fe(III) H ₂ O	0,0524
EDTA	0,0067
MgS ₂ O ₃ ·6H ₂ O	10,20
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	55,50
Tiamina	0,01
Vitamina B 12	0,01
Biotina	0,10
Glucosa	500

- 5 Posteriormente, se llenaron fermentadores de 2,5 l (Pierre Guerin) con 600 ml de medio mineral (B2) y se inocularon hasta una concentración de biomasa de 2,1 g.l⁻¹ con un volumen de precultivo que osciló entre 55 y 70 ml.

- 10 La temperatura del cultivo se mantuvo constante a 37 °C y el pH se mantuvo al valor del tratamiento (6,8) por adición automática de disoluciones de NH₄OH (NH₄OH 10% durante 9 horas y NH₄OH 28% hasta el final del cultivo). La velocidad de agitación inicial se estableció a 200 RPM durante la fase del lote y se aumentó hasta 1000 RPM durante la fase del lote alimentado. La tasa de flujo de aire inicial se fijó a 40 NL.h⁻¹ durante la fase del lote y se aumentó hasta 100 NL.h⁻¹ al comienzo de la fase del lote alimentado. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en valores entre 20 y 40%, preferiblemente 30% de saturación aumentando la agitación.

Quando la masa celular alcanzó una concentración cercana a 5 g.l⁻¹, se inició el lote alimentado con un caudal inicial de 5 ml.h⁻¹. La disolución de alimentación se inyectó a un perfil sigmoideal con un caudal en aumento que alcanzó 24 ml.h⁻¹ después de 26 horas de crecimiento. Las condiciones precisas de alimentación se calcularon con la siguiente

ecuación:

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

en donde Q(t) es el caudal de alimentación en ml.h⁻¹ para un volumen de lote de 600 ml con p1 = 1,80, p2 = 22,40, p3 = 0,270, p4 = 6,5.

- 5 Después de 26 horas, la bomba de disolución de alimentación del lote alimentado se detuvo y el cultivo finalizó después del agotamiento de la glucosa.

Se cuantificaron aminoácidos extracelulares por HPLC después de la derivación de OPA/Fmoc, y se analizaron otros metabolitos relevantes usando HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa) y GC-MS después de la siilación.

- 10 Tabla 10: Rendimiento máximo de metionina ($Y_{\text{met max}}$) en % g de metionina por g de glucosa producido en un cultivo de lote alimentado por las distintas cepas. Para la definición de rendimiento de metionina/glucosa, véase a continuación. SD indica la desviación estándar para los rendimientos que se calculó en base a varias repeticiones (N = número de repeticiones).

Cepa	$Y_{\text{met max}}$	SD
Cepa 10* N=5 (comparativa)	16,94	0,86
Cepa 13* N=3	20,72	0,60
Cepa 12 N=2	22,39	0,46
Cepa 15 N=1	22,27	Nd
Cepa 22 N=1	23,68	Nd
Cepa 18 N=3	23,69	0,52
Cepa 20 N=1	22,57	Nd

* Las cepas 10 y 13 se cultivaron respectivamente con 49,1 y 55,5 g.l⁻¹ de tiosulfato de amonio y con 5 g.l⁻¹ de sulfato de magnesio en lugar de tiosulfato de sodio en el medio del lote alimentado. El medio del lote contenía 1 g.l⁻¹ de sulfato de magnesio en lugar de tiosulfato de magnesio para las dos cepas.

- 15 Como se observó previamente en los experimentos en matraces, de la misma manera, en un biorreactor, el rendimiento de metionina/glucosa ($Y_{\text{met max}}$) aumenta tras la sobreexpresión de *pntAB* y la eliminación de *udhA* (comparar cepas 10 y 13 de la tabla 10).

- 20 Asimismo, demostramos que una regulación ajustada de sobreexpresión de *pntAB* mejoró la producción de metionina, como se puede observar con las cepas 12, 15, 18, 20 y 22 de la tabla 10 anterior. La producción de metionina se modula por el nivel de expresión de los genes *pntAB*, y demostramos que es mejor con una sobreexpresión moderada de *pntAB*.

El volumen del fermentador se calculó añadiendo al volumen inicial la cantidad de disoluciones añadidas para regular el pH y para alimentar el cultivo, y restando el volumen utilizado para muestreo y que se perdió por evaporación.

- 25 El volumen del lote alimentado se siguió continuamente pesando la carga de alimentación. La cantidad de glucosa inyectada se calculó luego en base al peso inyectado, la densidad de la disolución y la concentración de glucosa determinada por el método de Brix ([Glucosa]). El rendimiento de metionina se expresó de la siguiente manera:

$$Y_{\text{met}} = \frac{\text{Metionina}_t * V_t - \text{Metionina}_0 * V_0 \times 100}{\text{Glucosa}_t \text{ consumida}}$$

El rendimiento máximo obtenido durante el cultivo se presentó aquí para cada cepa.

- 30 Con metionina₀ y metionina_t respectivamente, las concentraciones de metionina iniciales y finales y V₀ y V_t, los volúmenes t iniciales e instantáneos.

La glucosa consumida se calculó de la siguiente manera:

$$\text{volumen alimentado}_t = \frac{\text{peso alimentado}_0 - \text{peso alimentado}_t}{\text{densidad de disolución alimentada}}$$

$$\text{Glucosa inyectada}_t = \text{volumen alimentado}_t * [\text{Glucosa}]$$

Glucosa consumida_t = [Glucosa]₀ * V₀ + Glucosa inyectada - [Glucosa]_{residual} * V_t con [Glucosa]₀, [Glucosa], [Glucosa]_{residual} respectivamente, las concentraciones de glucosa inicial, alimentada y residual.

XV. Ejemplo 15: Actividad de transhidrogenasa

- 5 Los resultados descritos en el ejemplo 14, tabla 10 se confirman por el análisis de las actividades de transhidrogenasa llevadas a cabo por PntAB (Tabla 11). Como se observó previamente en los experimentos en matraces, las actividades de la transhidrogenasa aumentan tras la sobreexpresión de *pntAB* (véanse las cepas 10 y 13 de la tabla 11). Asimismo, una regulación ajustada de la sobreexpresión de *pntAB* redujo aproximadamente 10 veces las actividades de la transhidrogenasa, como se puede observar con la cepa 18 de la tabla 11.
- 10 Tabla 11: Las actividades de transhidrogenasa (TH, PntAB) se determinaron en las cepas anteriormente descritas y se exponen en mUI/mg de proteínas (N = dos puntos mínimos de cultivos de fermentadores independientes).

Cepa	TH
Cepa 10 (N = 3) (comparativa)	0,4 ± 0,5
Cepa 13 (N = 7)	1493 ± 134
Cepa 12 (N=9)	1288 ± 128
Cepa 15 (N = 9)	1271 ± 61
Cepa 18 (N = 6)	130 ± 18

Las actividades de la transhidrogenasa (TH) se ensayaron como se describió previamente en el Ejemplo 13. Todos los resultados son el promedio de por lo menos tres mediciones.

15 Referencias

- Saunderson, C.L., (1985) British Journal of Nutrition 54, 621-633
- Ouzonis, C. A., and Karp, P. D. (2000) Genome Res. 10, 568-576
- Verho et al., (2003) Applied and Environmental Microbiology 69, 5892-5897
- Chemler et al., (2007) Applied and Environmental Microbiology 77, 797-807
- 20 • Alper, H. et al., (2005) Metab. Eng. 7, 155-164
- Kelle T et al., (2005) L-lysine production; In: Eggeling L, Bott M (eds) Handbook of corynebacterium glutamicum. CRC, Boca Raton, pp467-490
- Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A, Fischer E., "The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of Escherichia coli. ", 2004, JBC, 279: 6613-6619
- 25 • Jackson JB, "Proton translocation by transhydrogenase.", 2003, FEBS Lett 545:18-24
- Moreira dos Santos M, Raghevendran V, Kötter P, Olsson L, Nielsen J. Metab Eng. 2004 Oct;6(4):352-63, "Manipulation of malic enzyme in Saccharomyces cerevisiae for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments."

- Weckbecker and Hummel, *Biotechnol Lett.* 2004 Nov;26(22):1739-44, "Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenase and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase"
- 5 • Sanchez AM, Andrews J, Hussein I, Bennett GN, San KY., *Biotechnol Prog.* 2006 Mar-Apr;22(2):420-5, "Effect of overexpression of a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (UdhA) on the production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*."
- Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640-6645
- Carrier and Keasling (1998) *Biotechnol. Prog.* 15, 58-64
- 10 • Amann E, Brosius J, Ptashne M., *Gene.* 1983 Nov;25(2-3):167-78, "Gene Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*."
- Amann E, Ochs B, Abel KJ. *Gene.* 1988 Sep 30;69(2):301-15. "Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*."
- 15 • Hawley & McClure, *Nucleic Acids Res.* 1983 Apr 25;11(8):2237-55. "Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter ADN sequences".
- Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128
- Miller, 1992; "A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Schaefer et al. 1999, *Anal. Biochem.* 270: 88-96
- 20 • Liebl et al., 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210
- Riedel et al. 2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583
- Dennis & Zyltra, *AEM* july 1998, p 2710-2715
- Mermet-Bouvier & Chauvat, 1994, *Current Microbiology*, vol. 28, pp 145-148
- Tsurimoto T, Hase T, Matsubara H, Matsubara K, *Mol Gen Genet.* 1982;187(1):79-86
- 25 • Orosz A, Boros I and Venetianer P. *Eur. J. Biochem.* 1991 Nov 1;201(3):653-9
- Norrander et al., 1983, *Gene* 26,101-106
- Harrington K.J., Laughlin R.B. and Liang S. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 24;98(9):5019-24.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> EXPLORADOR METABÓLICO DISCHERT, WANDA VASSEUR, PERRINE BOISART, CEDRIC FIGGE, RAINER	
	<120> AUMENTO DE LA DISPONIBILIDAD DE NADPH PARA LA PRODUCCIÓN DE METIONINA.	
	<130> D29021	
10	<150> EP 10306164.4 < 151> 2010-10-25	
	<150> US 61/403,249 < 151> 2010-10-25	
	<160> 51	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1 < 211> 23 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
20	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 1 ggtattccac gggatttttc gcg	23
25	<210> 2 < 211> 25 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Oligonucleótido	
30	<400> 2 cgtagtaac cacattgcct gttgg	25
	<210> 3 < 211> 122 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
35	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 3 acgtttaaatac tatcaccgca agggataaat atctaaccac gtgcgtgttg acaattttac	60
	ctctggcggg gataatgggt gcatgtacta aggagggttat aaatgagagt gttgaagtgc	120
	gg	122

	<210> 4 < 211> 88 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
5	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 4 taaaaaaaat aagagttacc atttaaggta actcttattt ttagggcccg gtaccagct	60	
	tttgttcct ttagtgaggg ttaattgc	88	
10	<210> 5 < 211> 50 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220> < 223> Oligonucleótido		
15	<400> 5 cgtagtaac gaattcgact agaaagtatg tgagcaacta tcggccccc		50
	<210> 6 < 211> 88 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
20	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 6 gcttgtatac aacagataaa acgaaaggcc cagtctttcg actgagcctt tcgttttatt	60	
	tgatgaggct gcgctacggc actcacgg	88	
25	<210> 7 < 211> 82 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220> < 223> Oligonucleótido		
30	<400> 7 agactgggcc ttctgtttta tctgttgtat acaagcttaa ttaagggccc gggcggatcc	60	
	cccaaaacaa agcccggttc gc	82	
35	<210> 8 < 211> 36 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220> < 223> Oligonucleótido		

	<400> 8 cgtagttaac gaattcagct gatattcgcc acgggc	36
5	<210> 9 < 211> 35 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Oligonucleótido	
10	<400> 9 tcccccgggg tatactgtag gctggagctg cttcg	35
	<210> 10 < 211> 30 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
15	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 10 gccaagctt catatgaata tctccttag	30
20	<210> 11 < 211> 19 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Oligonucleótido	
25	<400> 11 gggctgatgc tgattgaac	19
	<210> 12 < 211> 22 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
30	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 12 gtgttaccga cgccgtaaac gg	22
35	<210> 13 < 211> 128 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
40	<220> < 223> Oligonucleótido	

	<400> 13	
	gcaagctagc tcactcgttg agaggaagac gaaaatgact ccgtttatga ctgaagattt	60
	cctgttagat accgtcacac tggctcacct tcgggtgggc etttctgctg taggctggag	120
	ctgcttcg	128
5	<210> 14 < 211> 129 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 14	
	ttaacaactc atttcgactt tatagcgtta cgccgctttt gaagatcgcc gaattcgagc	60
	tcgggtaccgc gggatccatc togagatccg cggatgtata catgggcccc atatgaatat	120
10	cctccttag	129
	<210> 15 < 211> 21 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
15	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 15	
	ggtgtggtgg aaaattcgtc g	21
20	<210> 16 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Oligonucleótido	
25	<400> 16	
	gcattacgat tgccatacc	20
30	<210> 17 < 211> 24 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 17	
	cccactggcc tgtaatgt tcgg	24
35	<210> 18 < 211> 34 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	

<220>

< 223> Oligonucleótido

<400> 18

atgcgatatc gaccgtataa gcagcagaat aggc

34

5

<210> 19

< 211> 2218

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

< 220>

10

< 223> Fragmento DCP4-6::TT02-MCS::Km

<400> 19

ggcgcgccag gcctagggcc gacgatgtac gtcagggtgtg caacctcgcc gatccggtgg	60
ggcaggtaat cgatggcggc gtactggaca gcggcctgcg tcttgagcgt cgtcgcgtac	120
cgctgggggt tattggcgtg atttatgaag cgcgcccgaa cgtgacggtt gatgtcgctt	180
cgctgtgcct gaaaaccggt aatgcggtga tcctgcgcgg tggcaaagaa acgtgtcgca	240
ctaacgctgc aacggtggcg gtgattcagg acgccctgaa atcctgcggc ttaccggcgg	300
gtgccgtgca ggcgattgat aatcctgacc gtgcgctggt cagtgaatg ctgcgtatgg	360
ataaatacat cgacatgctg atcccgctg gtggcgctgg tttgcataaa ctgtgccgtg	420
aacagtcgac aatcccggtg atcacagggt gtataggcgt atgccatatt tacgttgatg	480
aaagtgtaga gatcgctgaa gcattaaaag tgatcgtaa cgcgaaaact cagcgtccga	540
gcacatgtaa tacggttgaa acgttgctgg tgaataaaaa catcgccgat agcttcctgc	600
ccgcattaag caaacaagt ggcgaaagcg gcgtgacatt acacgcagat gcagctgcac	660
tggcgagtt gcaggcaggc cctgcgaagg tggttgctgt taaagccgaa gagtatgacg	720
atgagtttct gtcattagat ttgaacgtca aaatcgtcag cgatcttgac gatgccatcg	780
cccatattcg tgaacacggc acacaacact ccgatgcgat cctgaccgc gatatgcgca	840
acgccagcg ttttgtaac gaagtggatt cgtccgctgt ttacgttaac gcctctacgc	900
gttttaccga cggcgccag tttggtctgg gtgcggaagt ggcggttaagc acacaaaaac	960
tccacgcgcg tggcccaatg gggctggaag cactgaccac ttacaagtgg atcggcattg	1020
gtgattacac cattcgtgcg taacatcaaa taaaacgaaa ggctcagtcg aaagactggg	1080
cctttcgttt tatctgttgt atacaagctt aataagggcc cgggcggatc ccaccacgtt	1140
tcctcctgtg ccgtatttgt gccattgtaa ccttggaat tcatcaaat actgttctga	1200
catcaggcag tgcagggtgca gacatttaag ccaattgctg ccgccattct ttgacgtagt	1260
caatcagggc gcggagcttt ggtgcaatat tgcgacgctg tgggaaatac agatagaagc	1320
ccggaattg tggagaag tcatcaagca gcgatacaag tttaccgctt tcaatatatg	1380
gcctgaaagt ttcttgagt gcaattgtta ttctccgcc ggcaagagcc agcctcaaca	1440
tcagacgcag atcattagtc gtaatctgcg gttcaatcgc aaggtcgaaa gttctccgt	1500
tttcttcaaa tggccagcga taaggcgcaa cctccgggga ctgacgccag ccgatacact	1560
tatgggtatt tccccggag gcgagaaagc actctccacg cccggccgca aggatcagga	1620
cgacgggggc aggcattgaat cctcctcctg atggagacgt acagaggcga cttctgccag	1680
cacggagagt gccagagtat gcgcatcccg ggctttgggg aatatccga cgggtgccc	1740
gatttgcggt gtttcctccc tggaccatcc cagctcgtgg agcttttgca gacgtaacgt	1800

	gtgggttcga tagctgccca atgcgcccag ataaaagggt tttgcttctc gcgcggcctg	1860
	caacactggc agctcccggg tgagatcatg gcacagcaaa atgaccgccg tatcgggtatc	1920
	gatctgagcg ctggctgagg ccggaaaaag atcgaagata tggctgtcat agcctgtggc	1980
	tgctgcaaga ctgcgggttg cctgcgcctc aagagaacgt ccgtaaatca tcagcctgac	2040
	gcatggcctg aacccacac caaagccatt gagattccag cccgtccggg tttgcgtggg	2100
	caggcacacc agcgattgtg cttgcggatc gtagcgcagc cccaccgggt ttctctgttc	2160
	caggcggttc agcacggcga gcagaggctg tgccgagcgt agggtaacctc ttaattaa	2218
5	<210> 20 < 211> 35 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Oligonucleótido	
10	<400> 20 tccccgggg tataccatat gaatacctc cttag	35
	<210> 21 < 211> 30 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
15	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 21 gccaagctt ttaggctgg agctgctcg	30
20	<210> 22 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Oligonucleótido	
25	<400> 22 gctcgagat ggttggaac	20
	<210> 23 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
30	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 23 tgagatgat gggctcaggc	20

<210> 24
< 211> 1156
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

5 <220>
< 223> Fragmento DtreBC::TT02-MCS

<400> 24
ggcgcgcgcg caatcaaaat cctgatgcaa cggctgtatg accaggggca tcgtaatatc 60
agttatctcg gcgtgccgca cagtgcgtg acaaccggta agcgacgtca cgaagcctac 120
ctggcgttct gcaaagcgca taaactgcat cccgttgccg ccctgccagg gcttgctatg 180
aagcaaggct atgagaacgt tgcaaaagt attacgcctg aaactaccgc cttactgtgc 240
gcaaccgaca cgctggcact tggcgcaagt aaatacctgc aagagcaacg catcgacacc 300
ttgcaactgg cgagcgtcgg taatacgccg ttaatgaaat tcctccatcc ggagatcgta 360
accgtagatc ccggttacgc cgaagctgga cgccaggcgg cttgccagtt gatcgcgacg 420
gtaaccgggc gcagcgaacc gcaacaaatc atcatccccg ccaccctgtc ctgatcgttt 480
cctgaacgat aaattgtgat ctcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc 540
ctttcgtttt atctgttgta tacaagctta ataaggccc gggcggatcc gtctgtcagt 600
atgttgtttt tgttgatttt tcaaccagca aattcattaa aaaatttaca tatcgtgta 660
gcgcccgtca tccgtacgct ctgcttttta ctttgagcta catcaaaaaa agctcaaaca 720
tccttgatgc aaagcactat atatagactt taaaatgcgt cccaacccaa tatgttgat 780
taatcgacta taattgctac tacagctccc cacgaaaaag gtgcggcggt gtggataagc 840
ggatggcgat tgcggaaagc accggaaaac gaaacgaaaa aaccggaaaa cgcctttccc 900
aatttctgtg gataacctgt tcttaaaaat atggagcgat catgacaccg catgtgatga 960
aacgagacgg ctgcaaagtg ccgttttaaat cagagcgcat caaagaagcg attctgcgtg 1020
cagctaaagc agcggaaagc gatgatgccg attattgcgc cactgttgcc gcggttgta 1080
gcgagcagat gcagggccgc aaccaggtgg atatcaatga gatccagacc gcagttgaaa 1140
atcagctgtt aattaa 1156

10 <210> 25
< 211> 109
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Oligonucleótido

15 <400> 25
tcccccgagg tatactgtag gctggagctg cttcgaagtt cctatacttt ctagagaata 60
ggaacttcgg aataggaact tcatttagat gggtagcgag ctogaattg 109

<210> 26
< 211> 101

	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		
	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
5	<400> 26		
	cccaagcttc atatgaatat cctccttagt tcctattccg aagttcctat tctctagaaa	60	
	gtataggaac ttcggcgcg atgggtaccg agctcgaatt g	101	
	<210> 27		
	< 211> 22		
	< 212> ADN		
10	< 213> Secuencia artificial		
	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 27		
	gtgccgaac atttgggagt gc	22	
15	<210> 28		
	< 211> 22		
	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 28		
	ggagatcaga ttcaccacat cc	22	
	<210> 29		
	< 211> 29		
25	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		
	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 29		
30	gcccggtact catgttttcg ggtttatgg	29	
	<210> 30		
	< 211> 28		
	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 30		
	ccgttattcc agtagtcg cg tgcaatgg	28	
	<210> 31		
40	< 211> 100		
	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		

	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 31 ggtgcgcgcg tcgcagttat cgagcgttat caaaatgttg gcggcggttg caccactgg	60	
	ggcaccatcc cgtcgaaagc catatgaata tcctccttag	100	
5	<210> 32 < 211> 100 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
10	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 32 cccagaatct cttttgtttc ccgatggaac aaaattttca gcgtgcccac gttcatgccg	60	
	acgatttgtg cgcgtgccag tgtaggctgg agctgcttcg	100	
15	<210> 33 < 211> 18 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220> < 223> Oligonucleótido		
20	<400> 33 gtgaatgaac ggtaacgc		18
	<210> 34 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
25	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 34 gatgctggaa gatggtcact		20
30	<210> 35 < 211> 116 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220> < 223> Oligonucleótido		
35	<400> 35 gctcgtacat gaggcagcttg tgtggctcct gacacaggca aaccatcatc aataaaaccg	60	
	attcacactg gctcaccttc gggtagggcct ttctgccata tgaatatcct ccttag	116	
	<210> 36 < 211> 129 < 212> ADN		

	< 213> Secuencia artificial	
	< 220>	
	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 36	
	gctgcaacac gggtttcatt ggtaaccgt tctcttggtg tgccaattcg catgatattc	60
	ccttccttcc acacattata cgagccggat gattaattgt caacagctct gtaggctgga	120
5	gctgcttcg	129
	<210> 37	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 37	
	ccactatcac ggctgaatcg	20
15	<210> 38	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
20	<400> 38	
	gtcccaggat tcagtaacgc	20
	<210> 39	
	< 211> 46	
	< 212> ADN	
25	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 39	
	cgtagttaac gaattcctgc gccaccgagc cagccagacc ttgcgc	46
30	<210> 40	
	< 211> 95	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 40	
	gcttgataac aacagataaa acgaaaggcc cagtctttcg actgagcctt tcgttttatt	60
	tgatggcggtt ctctctatata aagcctgcag caagc	95
	<210> 41	
	< 211> 90	

	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		
	< 220>		
	< 223> Oligonucleótido		
5	<400> 41 agactgggcc ttctgtttta tctgttgtat acaagcttaa ttaagggccc gggcggatcc atttgcgacc attcctggaa aaatggagtc	60 90	
	<210> 42		
	< 211> 47		
	< 212> ADN		
10	< 213> Secuencia artificial		
	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 42 cgtagttaac gaattccgcc cctctttca ggttgcgtag gccatac		47
15	<210> 43 < 211> 22 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 43 gccgttcaac actggctgga cg		22
	<210> 44 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 44 tgccattgca ggtgcatcgc		20
30	<210> 45 < 211> 53 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 45 acgcgtcgac ggtatcgata agcttcgttt aaacaagccc aaaggaagag tga		53
	<210> 46 < 211> 42 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
40			

	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 46 gtatcttgga tatgggcata tgtccacca gctattgtt ag		42
5	<210> 47 < 211> 42 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
10	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 47 ctaacaata gctggtggaa catatgccca tatccaagat ac		42
15	<210> 48 < 211> 115 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 48 tccccccggg gatccgaatt cgcagaaagg cccaccogaa ggtgagccag ctcgagggca	60	
20	aggacggggcg aacgaaacct ttcgtgccgt tcgctcatcc gccgtaaacc gccag	115	
	<210> 49 < 211> 129 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
25	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 49 gctgcaacac gggtttcatt ggtaaccgt tctcttggtg tgccaattcg catgatattc	60	
	ccttccttcc acacagtata cgagccggat gattaatcgt caacagctct gtaggctgga	120	
	gctgcttcg	129	
30	<210> 50 < 211> 129 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220> < 223> Oligonucleótido		
35	<400> 50 gctgcaacac gggtttcatt ggtaaccgt tctcttggtg tgccaattcg catgatattc	60	
	ccttccttcc acacatttta cgagccggat gattaatagc caacagctct gtaggctgga	120	
	gctgcttcg	129	

<210> 51
 < 211> 129
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

5 <220>
 < 223> Oligonucleótido

<400> 51
 gctgcaacac gggtttcatt ggttaaccgt tctcttggtg tgccaattcg catgatattc 60
 ccttccttcc acacactata cgagccggat gattaatggt caacagctct gtaggctgga 120
 gctgcttcg 129

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo modificado para una producción mejorada de metionina, en donde un microorganismo de la familia de *Enterobacteriaceae* optimizado para la producción de metionina se modifica para potenciar la actividad de la transhidrogenasa de PntAB por sobreexpresión de los genes que codifican PntAB.
- 5 2. El microorganismo según la reivindicación 1, en donde se modifica para atenuar la actividad de la transhidrogenasa UdhA eliminando el gen que codifica UdhA.
3. El microorganismo según las reivindicaciones 1 o 2, en donde se modifica para aumentar el metabolismo de un carbono potenciando por lo menos una de las siguientes actividades:
 - a. la actividad de metilenotetrahidrofolato reductasa, MetF por sobreexpresión del gen *metF* y/o por optimización de su traducción expresando el gen *metF* bajo el control del promotor fuerte de los promotores de la familia *Ptrc*.
 - 10 b. la actividad del complejo de escisión de glicina, GcvTHP y Lpd, por sobreexpresión del gen *gcvTHP* y del gen *lpd*
 - c. la actividad de serina hidroximetiltransferasa, GlyA por sobreexpresión del gen *glyA*
 - d. la actividad de metiltransferasa, MethH o MetE por sobreexpresión del gen *methH* o *metE*.
- 15 4. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde aumenta la expresión de por lo menos uno de los siguientes genes: *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysI*, *cysJ*, *cysH*, *cysE*, *serA*, *serB*, *serC*, alelo *metA* con sensibilidad de retroalimentación reducida, alelo *thrA* o *thrA* con sensibilidad de retroalimentación reducida.
5. El microorganismo según la reivindicación 4, en donde por lo menos uno de los genes enumerados está bajo el control de un promotor inducible.
- 20 6. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se potencia la expresión del gen que codifica la piruvato carboxilasa.
7. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde se atenúa la expresión de por lo menos uno de los siguientes genes del microorganismo: *pykA*, *pykF*, *purU*, *yncA* o *metJ*.
- 25 8. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho microorganismo es del género *Escherichia*.
9. Un método para la producción de metionina, que comprende las etapas de:
 - cultivar un microorganismo de la familia de *Enterobacteriaceae* modificado para una mejor producción de metionina en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno, y
 - 30 - recuperar la metionina o uno de sus derivados del medio de cultivo,
 en donde dicho microorganismo se modifica para presentar una actividad potenciada de la transhidrogenasa de PntAB por sobreexpresión de los genes que codifican PntAB.