

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 631**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2012** **PCT/EP2012/050417**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012** **WO12098042**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2012** **E 12700132 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2665826**

54 Título: **Procedimiento para la producción fermentativa de aminoácidos que contienen azufre**

30 Prioridad:

20.01.2011 EP 11151526

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

29.01.2018

73 Titular/es:

EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)

Rellinghauser Strasse 1-11

45128 Essen, DE

72 Inventor/es:

SCHNEIDER, FRANK;

MOLCK, STELLA y

BATHE, BRIGITTE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 651 631 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

Procedimiento para la producción fermentativa de aminoácidos que contienen azufre

La invención se refiere a un procedimiento para la producción fermentativa de aminoácidos seleccionados a partir del grupo L-metionina, L-cisteína, L-cistina, L-homocisteína y L-homocistina.

5 Los aminoácidos que contienen azúcar tienen un gran significado económico. La L-cisteína se emplea como aditivo para productos alimenticios, como sustancia de partida para productos activos farmacológicos (por ejemplo N-acetilcisteína), y para cosméticos. El aminoácido L-metionina juega un papel extraordinario en la alimentación de animales. Éste pertenece a los aminoácidos esenciales que no se pueden producir mediante biosíntesis en el metabolismo de animales vertebrados. Por consiguiente, en ganadería se debe asegurar que se absorba L-metionina en cantidades suficientes con la nutrición. No obstante, ya que la L-metionina está presente en plantas de piensos (como soja o cereales), en especial para cerdos y aves, en cantidades demasiado reducidas, para garantizar una alimentación animal óptima es ventajoso añadir metionina al pienso como aditivo. La D-metionina se puede transformar en L-metionina, biológicamente activa, por parte de los vertebrados. Por lo tanto, casi siempre se añade al pienso un racemato de D- y L-metionina. La L-homocisteína puede transformarse en L-metionina mediante transmetilación por parte de los animales y, por consiguiente, substituir a esta última.

En el estado de la técnica se producen aminoácidos, como metionina, mediante síntesis química. En este caso se hacen reaccionar en primer lugar acroleína y metilmercaptano para dar aldehído 3-metiltiopropiónico, que conduce a su vez a hidantoína, con cianuro, amoníaco y monóxido de carbono. Ésta se puede hidrolizar en último lugar para dar el racemato, una mezcla equimolar de ambos estereoisómeros D-, o bien L-metionina. Ya que la forma biológicamente activa de la molécula representa exclusivamente la forma L, la forma D contenida en el pienso se debe transformar en el metabolismo en la forma L activa solo a través de des- y transaminación.

En contrapartida a metionina, la mayor parte de aminoácidos naturales, proteinógenos, se producen predominantemente mediante fermentación de microorganismos. En este caso se aprovecha que los microorganismos disponen de vías de biosíntesis correspondientes para la síntesis de aminoácidos naturales. Además, muchos procedimientos de fermentación obtienen costes de producción muy reducidos, con eeductos económicos, como glucosa y sales minerales, y además proporcionan la forma L biológicamente activa del respectivo aminoácido.

No obstante, las vías biosintéticas de aminoácidos en cepas de tipo salvaje están sujetas a un fuerte control metabólico, que garantiza que los aminoácidos se obtengan solo para la demanda energética de la célula. Por lo tanto, una condición importante para procesos de producción eficientes consiste en que se encuentren disponibles microorganismos apropiados que, en contrapartida a los organismos de tipo salvaje, presentan un rendimiento de producción aumentado drásticamente para la producción de los aminoácidos deseados.

Tales microorganismos superproductores de aminoácidos se pueden generar mediante procedimientos de mutación/selección clásicos y/o mediante modernas técnicas recombinantes, selectivas ("metabolic ingeneering"). En el último caso se identifican en primer lugar genes o alelos, que provocan una superproducción de aminoácidos debido a su modificación, activación o desactivación. Estos genes/alelos se introducen o se desactivan entonces en una cepa de microorganismos mediante técnicas de biología molecular, de modo que se obtiene una superproducción óptima. No obstante, frecuentemente solo la combinación de varias medidas diferentes conduce a una producción realmente eficiente.

En *E. coli* y *C. Glutamicum*, la L-cisteína se deriva de L-serina desde el punto de vista bioquímico. La L-serina se activa mediante la serina acetiltransferasa CysE como O-acetilserina. La O-acetilserina (tiol)-liasa transfiere a continuación azufre reducido en forma de sulfuro, mediante lo cual se produce L-cisteína. En contrapartida a *C. Glutamicum*, la *E. coli* posee dos diferentes O-acetilserina (tiol)-liasas, pudiendo transferir la O-acetilserina (tiol)liasa B("CysM") también tiosulfato a o-acetilserina. De este modo se produce S-sulfocisteína, que se disocia a continuación de modo no caracterizado hasta ahora para dar L-cisteína y sulfito o sulfato (Kredich N.M. (1996) en Neidhardt FC et al. (Ed.) "Escherichia coli and Salmonella", 2ª edición, páginas 514-527).

L-metionina se deriva de aspartato, junto con lisina y treonina. El azufre se introduce en L-metionina en forma de L-cisteína (a través de cistationina como producto intermedio) mediante trans-sulfuración (en *C. glutamicum* y *E. coli*; única vía en *E. coli*). Paralelamente, por ejemplo en *C. glutamicum* existe la vía de sulfhidrilación directa, en la que se asimila sulfuro en forma de L-homocisteína (B-J Hwang, H-J Yeom, Y Kim, H-S Lee, 2002, J Bacteriol., 184(5): 1277-1286). El grupo C1 de la L-metionina procede del metabolismo de C1, y se transfiere a L-homocisteína por metionina-sintasas MetE y MetH (reseña: Greene RC (1996) en Neidhardt FC et al. (Hrsg.) "Escherichia coli and Salmonella", 2ª edición, páginas 542-560). La biosíntesis de L-metionina en *C. glutamicum* se describe en Rückert et al. (Rückert C, Pühler A, Kalinowski J, 2003, J Biotechnol., 104(1-3):213-28). Se describen cepas y procedimientos para la producción fermentativa de L-metionina, por ejemplo para *E. coli* (WO2006/001616), WO2009/043803) y *C.*

glutamicum (WO2009/144270).

El empleo de tiosulfato como fuente de azufre en la producción de aminoácidos que contienen azufre (frente a sulfato) permite rendimientos teóricos claramente más elevados (Krömer JO, Wittmann C, Schröder H, Heinzle E, Metab Eng., 2006, 8(4), páginas 353-369; así como WO2007/020295). La ventaja del tiosulfato se explica como sigue: en el sulfato (SO_4^{2-}), el átomo de azufre se presenta en la etapa de oxidación +6. Para la asimilación, éste se debe reducir a la etapa de oxidación -2 (sulfuro = S^{2-}). Para la reducción de un sulfato a sulfuro, la célula debe gastar 2 ATP y 4 NADPH (= 8 electrones). En el tiosulfato, el átomo de azufre central tiene la etapa de oxidación +5, y el terminal tiene la etapa de oxidación -1 (etapa de oxidación formal promedio de ambos átomos de azufre: +2). Por lo tanto, para la reducción de ambos átomos de azufre del tiosulfato se requieren solo 8 electrones, frente a 16 electrones en la reducción de 2 sulfatos.

El empleo de tiosulfato como fuente de S para la producción de L-cisteína con *E. coli* se describe, por ejemplo, en el documento DE 10 2007 007 333 y el documento WO2001/27307.

En el documento WO2007/077041 se mostró que también la producción de L-metionina en *E. coli* se puede mejorar significativamente mediante el empleo de tiosulfato en lugar de sulfato.

Hasta el momento no se ha mostrado experimentalmente que el empleo de tiosulfato conduzca a la mejora de la producción de L-metionina también en el caso de *C. glutamicum*. En el documento WO2007/020295 (página 240) se muestra que *C. glutamicum* forma más biomasa con tiosulfato sódico como fuente de azufre. Esto se valoró además como signo de un menor consumo de ATP y NADPH. Prácticamente no se investigó la producción de L-metionina con tiosulfato.

En *E. coli* se absorbe tiosulfato a través del transportador de sulfato/tiosulfato CysPUWA-Sbp (Kredich N.M. (1996) en Neidhardt FC et al. (Hrsg.) "Escherichia coli and Salmonella", 2ª edición, páginas 514-527). En el caso de CysP y Sbp se trata de dos proteínas enlazantes periplasmáticas diferentes. CysP posee una afinidad más elevada para tiosulfato y Sbp posee una mayor afinidad para sulfato. CysA forma el componente enlazante de ATP. CysU y CysW son los componentes transmembrana. En el documento WO2009/043803, se intensificó en *E. coli* la expresión del operón *cysPUWAM*, y de este modo se obtuvo una mejora de la producción de L-metionina. En el caso de *C. glutamicum* no se sabe nada sobre la absorción de tiosulfato. Mutantes *Knock out* del sistema de absorción de sulfato putativo CysZ (cg3112) pueden crecer aún con tiosulfato como fuente de S (Rückert C. et al. (2005), BMC Genomics., Vol. 6(121)). Por consiguiente, CysZ no es reponsable (en sí misma) del transporte de tiosulfato.

La O-acetilserina (tiol)-liasa B (=CysM, EC 2.5.1.47) posibilita el uso de *E. coli*, tiosulfato como fuente de S para la síntesis de L-cisteína y L-metionina. El enzima cataliza la formación de S-sulfocisteína (R-S-SO_3) y acetato a partir de O-acetilserina y tiosulfato. A continuación se disocia S-sulfocisteína de modo no caracterizado hasta la fecha para dar L-cisteína y sulfito o sulfato (Kredich N.M. (1996) en Neidhardt FC et al. (Hrsg.) "Escherichia coli and Salmonella", 2ª edición, páginas 514-527). El sulfato se reduce en tres pasos mediante la ATP-sulfurilasa (CysDN), la APS-quinasa (CysC) y la PAPS-sulfotransferasa (CysH) para dar sulfito (SO_3^{2-}). A continuación se reduce adicionalmente sulfito de la NADPH sulfito-reductasa para dar sulfuro (S^{2-}), que se puede emplear por la O-acetilserina (tiol)-liasa A (CysK) y la O-acetilserina (tiol)-liasa B (CysM) para la síntesis de una segunda molécula de L-cisteína. *C. glutamicum* puede crecer en medio mínimo con tiosulfato como fuente de S (Rückert C. et al. (2005), BMC Genomics., Vol. 6(121)). Sin embargo, *C. glutamicum* no posee O-acetilserina (tiol)-liasa B ("CysM") (Rückert und Kalinowski (2008) en A. Burkowski (ed.) "Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology", Caister Academic Press). Por lo tanto, el tiosulfato se debe asimilar de otro modo.

Es tarea de la presente invención poner a disposición una cepa de microorganismos que posibilite una superproducción más elevada de aminoácidos que contienen azufre, en especial de L-metionina.

Esta tarea se soluciona mediante un procedimiento para la producción fermentativa de aminoácidos que contienen azufre, seleccionados a partir del grupo L-metionina, L-cisteína, L-cistina, L-homocisteína y L-homocistina, que contiene los pasos:

a) puesta a disposición de un microorganismo de la familia Enterobacteriaceae o de un microorganismo de la familia Corynebacteriaceae, que codifica un gen para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa;

b) fermentación del microorganismo de a) en un medio que contiene como fuente de azufre inorgánica una sal de ácido tiosulfúrico o una mezcla de una sal de ácido tiosulfúrico y una sal de ácido sulfúrico, obteniéndose un caldo de fermentación, y

c) concentración del aminoácido que contiene ácido sulfúrico en el caldo de fermentación de b).

En el caso de tiosulfato-sulfurotransferasas, también llamadas "rodanasas" (EC 2.8.1.1), se trata de enzimas que transfieren el átomo de azufre reducido de tiosulfato a cianuro (CN').

Algunas tiosulfato-sulfurotransferasas pueden transferir el átomo de azufre reducido también a substratos alternativos, por ejemplo dihidrolipoato (Alexander K., Volini M, 1987, J. Biol. Chem., 262: 6595-6604). En el banco de datos "Clusters of Orthologous Groups of proteins" (COG), en la categoría COG0607 "Rhodanese-related sulfurtransferase" se encuentran actualmente 168 sulfurotransferasas homólogas en los tres dominios de la vida (Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Smirnov S, Sverdlov AV, Vasudevan S, Wolf YI, Yin JJ, Natale DA, 2003, BMC Bioinformatics, 4:41; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Las rodanasas poseen uno o varios dominios característicos similares a rodanasa ("Rhodanese-like domain"; banco de datos PFAM PF00581, <http://pfam.sanger.ac.uk/>; Gliubich F, Gazerro M, Zanotti G, Delbono S, Bombieri G, Berni R, 1996, J Biol Chem., 271(35):21054-61).

El gen RDL2 (Rhodanese-Like Protein) de *Saccharomyces cerevisiae* S288c codifica para la proteína de 149 aminoácidos de longitud Rdl2p. Éste posee un dominio similar a rodanasa ("Rhodanese-like domain", banco de datos PFAM PF00581, <http://pfam.sanger.ac.uk/>). Se mostró experimentalmente que, en el caso de Rdl2p, se trata de una tiosulfato-sulfurotransferasa (rodanasa, EC 2.8.1.1) (Foster MW, Forrester MT, Stamler JS, 2009, Proc Natl Acad Sci U S A, 106(45):18948-53). La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de ADN del gen RDL2. La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada a través de RDL2 Rdl2p.

E. coli posee, además de las rodanasas convenientemente caracterizadas GlpE y PspE (Adams H, Teertstra W, Koster M, Tommassen J, 2002, FEBS Lett. 518:173-6), otros siete enzimas parálogos con dominios similares a rodanasa (Cheng H, Donahue JL, Battle SE, Ray WK, Larson TJ, 2008, Open Microbiol J., 2:18-28) :

YgaP tiene un dominio N-terminal similar a rodanasa, y dos dominios transmembrana. Éste muestra actividad de Rhodanasa *in vitro* (Ahmed, F., 2003, Dissertation).

YbbB es una tARN 2-selenouridina sintasa y tiene un dominio N-terminal similar a rodanasa (Wolfe MD, Ahmed F, Lacourciere GM, Lauhon CT, Stadtman TC, Larson TJ, 2004, J Biol Chem., 279(3):1801-1809).

Thil es necesario para la síntesis de tiamina, y juega un papel en la reacción de uridina para dar 4-tiouridina en posición 8 en tARN (Palenchar PM, Buck CJ, Cheng H, Larson TJ, Mueller EG, 2000, J Biol Chem., 275(12):8283-8286).

SseA es una 3-mercaptopiruvato:cianuro sulfurotransferasa, que transfiere preferentemente 3-mercaptopiruvato en lugar de tiosulfato a cianuro (Colnaghi R, Cassinelli G, Drummond M, Forlani F, Pagani S, 2001, FEBS Lett., 500(3):153-156). El enzima tiene dos dominios similares a rodanasa.

El ORF ynjE codifica para una sulfurotransferasa putativa con tres dominios similares a rodanasa (Hänzelmann P, Dahl JU, Kuper J, Urban A, Müller-Theissen U, Leimkühler S, Schindelin H., 2009, Protein Sci., 18(12):2480-2491).

El ORF yibN codifica para una sulfurotransferasa putativa con un dominio C-terminal similar a rodanasa.

El ORF yceA codifica para una sulfurotransferasa putativa con un dominio similar a rodanasa.

En *Corynebacterium glutamicum* codifican al menos 7 ORFs para supuestas sulfurotransferasas:

El ORF thtR (=cg0803, NCgl0671) codifica para una sulfurotransferasa putativa con dos dominios similares a rodanasa y una longitud de 301 aminoácidos.

El ORF sseA2 (=cg1613, NCgl1369) codifica para una sulfurotransferasa putativa con dos dominios similares a rodanasa y una longitud de 289 aminoácidos.

El ORF cg3000 (=NCgl2616) codifica para una sulfurotransferasa putativa con un dominio similar a rodanasa y una longitud de 96 aminoácidos.

El ORF cg0073 (=NCgl0053) codifica para una sulfurotransferasa putativa con un dominio similar a rodanasa y una longitud de 97 aminoácidos.

El ORF cg0074 (=NCgl0054) codifica para una sulfurotransferasa putativa con un dominio similar a rodanasa y una

longitud de 197 aminoácidos.

El ORF sseA1 (=cg3073, NCgl2678) codifica para una sulfurotransferasa putativa con dos dominios similares a rodanasa y una longitud de 274 aminoácidos.

- 5 El ORF cg3319 (=NCgl2890) codifica para una sulfurotransferasa putativa con un dominio similar a rodanasa y una longitud de 312 aminoácidos.

La tiosulfato-sulfurotransferasa vacuna (*Bos taurus*) posee dos dominios similares a rodanasa y está convenientemente caracterizada (Cannella C, Costa M, Pensa B, Ricci G, Pecci L, Cavallini D., 1981, Eur J Biochem., 119(3):491-495).

- 10 En una forma preferente de realización del procedimiento, el microorganismo sobreexpone uno o varios genes que codifican para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa; seleccionándose el polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa seleccionada a partir de los siguientes a) a d):

- 15 a) un polipéptido constituido por, o que contiene lo polipéptidos Rdl2p, GlpE, PspE, YgaP, Thil, YbbB, SseA, YnjE, YceA, YibN, NCgl0671, NCgl1369, NCgl2616, NCgl0053, NCgl0054, NCgl2678, NCgl2890; tiosulfato-sulfurotransferasa de mamíferos, a modo de ejemplo la tiosulfato-transferasa de hígado vacuno (*Bos taurus*); preferentemente Rdl2p, GlpE, PspE, y de modo especialmente preferente Rdl2p;

b) un polipéptido constituido por, o que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

c) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 70 % o más a la secuencia de aminoácidos de a) o b), presentando el polipéptido actividad de tiosulfato-sulfurotransferasa;

- 20 d) un polipéptido, que presenta una secuencia de aminoácidos que contiene una delección, substitución, inserción y/o adición de 1 a 45 restos aminoácido respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, presentando el polipéptido actividad de tiosulfato-sulfurotransferasa.

25 Como se ha mencionado anteriormente, los polipéptidos con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa comprenden también variantes de los enzimas citados en a), o bien b), con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 70 % o más a la secuencia de aminoácidos de las secuencias citadas en a), o bien b), presentando las variantes actividad de tiosulfato-sulfurotransferasa. En formas de realización preferentes están incluidas variantes que son al menos un 75 %, al menos en un 80%, al menos en un 85%, al menos en un 90%, al menos en un 95%, al menos en un 98% o al menos en un 99% idénticas a las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente, es decir, siendo al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de las posiciones de aminoácidos idénticas a las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente. La identidad porcentual se calcula preferentemente a lo largo de la longitud total del aminoácido o de la región de ácidos nucleicos. El especialista dispone de una serie de programas que se basan en una pluralidad de algoritmos para la comparación de secuencias. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman proporcionan resultados especialmente fiables. Para el alineamiento de las secuencias se dispone del programa PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) o del programa Gap y BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970)) y Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))], que pertenecen al paquete de software GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)]. Los valores porcentuales indicados anteriormente para la identidad de secuencias se calculan preferentemente con el programa GAP a través de la región de la secuencia total.

- 40 Los polipéptidos con actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa comprenden además fragmentos de los enzimas citados en a), o bien b). Estos fragmentos presentan la actividad descrita anteriormente. Un fragmento de un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa en el sentido de esta solicitud de patente contiene preferentemente al menos 30, al menos 50, o al menos 80 restos aminoácido sucesivos de una de las secuencias de aminoácidos citadas anteriormente.

- 45 Como se menciona más arriba, los polipéptidos con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa comprenden también variantes de los enzimas citados en a), o bien b), que presentan una secuencia de aminoácidos que contiene una delección, substitución, inserción y/o adición de 1 a 45 restos aminoácido respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, presentando el polipéptido actividad de tiosulfato-sulfuro transferasa. En formas de realización preferentes, la secuencia de aminoácidos contiene una delección, substitución, inserción y/o adición de 1 a 40, de modo más preferente 1 a 30, de modo aún más preferente de 1 a 20, preferentemente de 1 a 15, de modo aún más preferente de 1 a 10, y del modo más preferente 1 a 5 restos aminoácido, respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

En otra variante preferente, el polipéptido se codifica por un gen que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, que corresponde a la secuencia de tipo salvaje del gen RDL2 de *Saccharomyces cerevisiae* S288c.

Además es preferente que el polipéptido se codifique por un gen que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3. En este caso, el empleo de codón está adaptado ligeramente al de *E.coli* en este caso.

- 5 En otra variante preferente, el polipéptido se codifica por un gen que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:4. El empleo de codón está adaptado más intensamente al de *E.coli* en este caso.

Además es preferente que el polipéptido se codifique por un gen que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:5. El empleo de codón está adaptado completamente al de *E.coli* en este caso.

- 10 En la puesta en práctica del procedimiento según la invención, la expresión del gen que codifica para el polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa, se aumenta preferentemente mediante una o varias de las siguientes medidas:

- 15 a) la expresión del gen es controlada por un promotor, que conduce a una expresión intensificada frente a la cepa de partida en el microorganismo empleado para el procedimiento. En este caso se puede emplear, a modo de ejemplo, un promotor de GAPDH constitutivo del gen gapA de *Escherichia coli*, o un promotor de lac, tac, trc, lambda, ara o tet inducible (reseña: Makrides SC. Micro-biol Rev. 1996 Sep; 60(3):512-38).

- b) El número de copias del gen que codifica para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa se aumenta frente a la cepa de partida. Esto se puede conseguir, a modo de ejemplo, insertándose el gen en plásmidos con número de copias elevado, o integrándose el gen en el cromosoma del microorganismo en varias copias (Baneyx F, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10, 411-421).

- 20 c) La expresión del gen se efectúa bajo empleo de un punto de enlace ribosómico, que conduce a una translación intensificada frente a la cepa de partida en el microorganismo empleado para el procedimiento (Makrides SC. Microbiol Rev. 1996 Sep;60(3):512-38).

- 25 d) La expresión del gen se intensifica mediante una optimización del empleo de codón (codon usage) del gen, referido al microorganismo empleado para el procedimiento (Welch, Villalobos, Gustafsson and Minshull, J R Soc Interface, 2009, 6:5467-76). Como medida de la adaptación del empleo de codón de un gen a un organismo es apropiado, a modo de ejemplo, el "Codon Adaptation Index" (CAI) (Sharp PM, Li WH, 1987, Nucleic Acids Res., 15(3):1281-95).

- 30 e) La expresión del gen se intensifica mediante la reducción de estructuras secundarias de mRNA en el mRNA transcrito por el gen (Kudla G, Murray AW, Tollervey D, Plotkin JB., Science, 2009 Apr 10;324(5924):255-8; Welch, Villalobos, Gustafsson and Minshull, J R Soc Interface, 2009, 6:5467-76).

- f) La expresión del gen se intensifica mediante la eliminación de terminadores de ARN-polimerasa en el mRNA transcrito por el gen (Welch, Villalobos, Gustafsson and Minshull, J R Soc Interface, 2009, 6:5467-76).

- 35 g) La expresión del gen se efectúa bajo empleo de secuencias estabilizadoras de mRNA en el mRNA transcrito por el gen (Carrier TA, Keasling JD, Biotechnol Prog., 1997, Nov-Dec; 13(6):699-708). Como ejemplo se puede citar la secuencia ARNmst17 para la estabilización del mRNA del gen metF de *E. coli* (WO2009/043803).

- 40 En otra forma de realización del procedimiento según la invención es preferente que, en el caso de la sal de ácido tiosulfúrico, se trate de una sal seleccionada a partir del grupo sal alcalina, sal alcalinotérrica, sal amónica y mezclas de las mismas, preferentemente sal amónica.

Además es preferente que, en el caso de la sal de ácido sulfúrico, se trate de una sal seleccionada a partir del grupo sal alcalina, sal alcalinotérrica, sal amónica (y mezclas), preferentemente sal amónica.

- 45 La concentración de sal de ácido tiosulfúrico en el medio, o bien en el caldo de fermentación, asciende preferentemente a 0,05 g/kg hasta 100 g/kg, preferentemente a 0,1 g/kg hasta 20 g/kg, y de modo especialmente preferente a 0,2 g/kg hasta 12 g/kg.

En un procedimiento preferente, la concentración de sal de ácido tiosulfúrico en el medio, o bien en el caldo de fermentación, se mantiene durante la fermentación en al menos 0,05 g/kg a 100 g/kg, preferentemente 0,1 g/kg a 20

g/kg, y de modo especialmente preferente 0,2 g/kg a 12 g/kg.

En otro procedimiento preferente, la fracción de sal de ácido tiosulfúrico, referida al contenido total en azufre inorgánico en el medio y en el caldo de fermentación, se mantiene en al menos un 5 % en moles durante la fermentación.

- 5 El procedimiento según la invención puede estar configurado como procedimiento por cargas, procedimiento por cargas de alimentación, procedimiento por cargas de alimentación reiteradas, y procedimiento continuo.

Además, el aminoácido que contiene azufre se puede obtener a partir del caldo de fermentación como producto sólido, o disuelto en un producto líquido.

- 10 En un procedimiento preferente de la presente invención, en el caso del aminoácido que contiene azufre a producir se trata de L-metionina.

Además es preferente que, en el caso del microorganismo, se trate de la especie *Escherichia*, de modo especialmente preferente del tipo *Escherichia coli*.

En un procedimiento alternativo, en el caso del microorganismo se trata de la especie *Corynebacterium*, de modo especialmente preferente del tipo *Corynebacterium glutamicum*.

- 15 En un procedimiento especialmente preferente de la presente invención, el microorganismos se selecciona a partir de:

- *Corynebacterium glutamicum* con actividad y/o expresión de aspartato quinasa elevada y debilitamiento o delección de la proteína reguladora McbR en comparación con la cepa de partida;
- *Escherichia coli*, con actividad y/o expresión de aspartato quinasa elevada y debilitamiento o delección de la proteína reguladora MetJ en comparación con la cepa de partida.

20

La invención pone a disposición además un microorganismo seleccionado a partir de

- *Corynebacterium glutamicum* con actividad y/o expresión de aspartato quinasa elevada y debilitamiento o delección de la proteína reguladora McbR en comparación con la cepa de partida;
- *Escherichia coli*, con actividad y/o expresión de aspartato quinasa elevada y debilitamiento o delección de la proteína reguladora MetJ en comparación con la cepa de partida; excretando o produciendo el microorganismo L-metionina, y sobreexpresando el microorganismo un gen que codifica para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa.

25

La cepa de *C. glutamicum* que excreta o produce L-metionina presenta preferentemente una actividad enzimática de aspartato quinasa intensificada (EC 2.7.2.4), siendo preferentes alelos resistentes a retroalimentación. En el caso de corinebacterias, esta aspartato quinasa se codifica por el gen *lysCt*. Además, mediante el debilitamiento o la delección de la proteína reguladora McbR (que se codifica por el gen *mcbR*) se efectúa un aumento del aprovechamiento de azufre. McbR representa el represor de la cascada de aprovechamiento de azufre total en *C. glutamicum* (Rey DA, Nentwich SS, Koch DJ, Rückert C, Pühler A, Tauch A, Kalinowski J., Mol Microbiol., 2005,56(4):871-887).

30

- 35 La cepa que excreta o produce L-metionina de *E. coli* presenta preferentemente una actividad enzimática intensificada (EC 2.7.2.4), siendo preferentes alelos resistentes a retroalimentación. En *E. coli* existen tres aspartato quinastas diferentes, que se codifican por los genes *thrA*, *metL* o *lysC*. Mediante el debilitamiento o la delección de la proteína reguladora MetJ, que se codifica por el gen *metJ*, se efectúa un aumento de la biosíntesis de L-metionina. MetJ constituye el represor principal de la biosíntesis de L-metionina en *E. coli*.

- 40 Además es preferente que este microorganismo sobreexpresa uno o varios genes que codifican para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa, seleccionándose el polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa seleccionada a partir de los siguientes a) a d):

45

- a) un polipéptido constituido por, o que contiene lo polipéptidos Rdl2p, GlpE, PspE, YgaP, Thil, YbbB, SseA, YnjE, YceA, YibN, NCgl0671, NCgl1369, NCgl2616, NCgl0053, NCgl0054, NCgl2678, NCgl2890;

tiosulfato-sulfurotransferasa de mamíferos, a modo de ejemplo la tiosulfato-transferasa de hígado vacuno (*Bos taurus*); preferentemente Rdl2p, GlpE, PspE, y de modo especialmente preferente Rdl2p;

b) un polipéptido constituido por, o que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

5 c) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 70 % o más a la secuencia de aminoácidos de a) o b), presentando el polipéptido actividad de tiosulfato-sulfurotransferasa;

d) un polipéptido, que presenta una secuencia de aminoácidos que contiene una delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 45 restos aminoácido respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, presentando el polipéptido actividad de tiosulfato-sulfurotransferasa.

10 Además, la cepa de partida del microorganismo se deriva preferentemente del grupo constituido por *Escherichia coli* MG1655, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* DH10B, *Escherichia coli* BW2952, *Escherichia coli* REL606, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium glutamicum* R, *Corynebacterium glutamicum* DSM20411 (denominación antigua *Brevibacterium flavum*), *Corynebacterium glutamicum* DSM20412 (denominación antigua *Brevibacterium lactofermentum*), *Corynebacterium glutamicum* DSM1412 (denominación antigua *Brevibacterium lactofermentum*), *Corynebacterium efficiens* YS-314^T
15 (=DSM44549), *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608, *Corynebacterium glutamicum* DSM17322.

Otra cepa que excreta, o bien produce L-metionina, es, a modo de ejemplo, la cepa de producción de *E. coli* MG1655 Δ metJ Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP que contiene el plásmido de producción pME101-thrA*1-cysE-Pgap-metA*11 (WO2009/043803).

20 La clonación de la cepa de producción de *E. coli* MG1655 Δ metJ Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP se describe en la solicitud de patente WO2009/043803. La cepa se basa en la cepa de tipo salvaje de *E. coli* K12 MG1655. En el genoma de esta cepa se introdujeron las siguientes modificaciones:

- se eliminó el gen para el represor de biosíntesis de L-metionina *metJ*.
- En línea de entrada del gen *metH* (que codifica para la metionina sintasa dependiente de cobalamina) se insertó el promotor trc fuerte.
- 25 • En línea de entrada del gen *metF* (que codifica para la 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa) se insertó el promotor trc fuerte.
- En línea de entrada del operón *cysPUWAM* se insertó el promotor trcF fuerte. *cysPUWA* codifica para un transportador de absorción de sulfato/tiosulfato. *cysM* codifica para la cisteína-sintasa B.
- 30 • En línea de entrada del operón *cysJIH* se insertó el promotor trcF fuerte. *cysJI* codifica para la sulfito reductasa y *cysH* codifica para la 3'-fosfo-adenililsulfato-reductasa.
- En línea de entrada del operón *gcvTHP* se insertó el promotor trc09 fuerte. *gcvT*, *gcvH* y *gcvP* codifican para tres componentes del sistema de división de glicina.

35 La clonación del plásmido de producción de *E. coli* pME101-thrA*1-cysE-Pgap-metA*11 se describe en la solicitud de patente WO2007/077041. Se trata de un plásmido de número de copias reducido (*low copy* plasmid) a base del vector pCL 1920 (Lerner, C.G. and Inouye, M., Nucl. Acids Res. (1990) 18:4631 [PMID: 2201955]). El plásmido vacío pME101 posee el gen *lacI^q*, que codifica para un alelo fuertemente exprimido del represor lac. En línea de salida de un promotor trc fuerte, reprimible mediante el represor Lac, se clonó el gen *thrA*1*. Éste codifica para una variante resistente a retroalimentación de aspartato quinasa / homoserina dehidrogenasa ThrA de *E. coli*. En la misma orientación se encuentra el gen *cysE* junto con su promotor natural. Éste codifica para la serina-acetiltransferasa de
40 *E. coli*. En línea de salida de *cysE* sigue el promotor *gapA* fuerte de *E. coli*, que controla la expresión del gen *metA*11*. *metA*11* codifica para una variante resistente a retroalimentación de homoserina O-succiniltransferasa de *E. coli*.

Como ejemplos de otros microorganismos que extretan, o bien producen L-metionina, se pueden citar las siguientes cepas:

- 45 • *C. glutamicum* M1179 (=DSM17322) (WO2007/011939)

- *E. coli* TF4076BJF metA#10 + metYX(Lm) (WO2008/127240; página 46);
 - *E. coli* W3110ΔJ/pKP451 (EP 1 445 310 B1, página 7 ejemplo 4)
 - *E. coli* WΔthrBCΔmetJmetK32 pMWPthrmetA4Δ5Δ9 (Yoshihiro Usuda and Osamu Kurahashi, 2005, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 71, Nº 6, páginas 3228-3234)
- 5 • W3110/pHC34 (WO01/27307 página 13, ej. 3).

Se describen otros ejemplos de diversos microorganismos apropiados en Gomes et al. (Enzyme and Microbial Technology 37 (2005), 3-18).

Las bacterias que producen L-metionina pueden poseer una o varias de las características seleccionadas a partir de los siguientes grupos:

- | | |
|----|---|
| 10 | 1) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para uno o varios componentes del sistema de transporte de tiosulfato/sulfato CysPUWA (EC 3.6.3.25), |
| | 2) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato reductasa CysH (EC 1.8.4.8), |
| 15 | 3) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para uno o varios componentes der sulfito reductasa CysJI (EC 1.8.1.2), |
| | 4) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una cisteína sintasaA CysK (EC 2.5.1.47), |
| | 5) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una cisteína sintasaB CysM (EC 2.5.1.47), |
| | 6) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una serina acetiltransferasa CysE (EC 2.3.1.30), |
| 20 | 7) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para uno o varios componentes del sistema de división de glicina GcvTHP-Lpd (EC 2.1.2.10, EC 1.4.4.2, EC 1.8.1.4), |
| | 8) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una lipoil sintasa LipA (EC 2.8.1.8), |
| | 9) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una lipoil-proteína ligasa LipB (EC 2.3.1.181), |
| | 10) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una fosfoglicerato dehidrogenasa SerA (EC 1.1.1.95), |
| | 11) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una 3-fosfoserina fosfatasa SerB (EC 3.1.3.3), |
| 25 | 12) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una 3-fosfoserina/fosfohidroxitreonina aminotransferasa SerC (EC 2.6.1.52), |
| | 13) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una serina hidroximetiltransferasa GlyA (EC 2.1.2.1), |
| | 14) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una aspartoquinasa I y homoserina dehidrogenasa I ThrA (EC 2.7.2.4, EC 1.1.1.3), |
| 30 | 15) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una aspartato quinasa LysC (EC 2.7.2.4), |
| | 16) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para un homoserina-dehidrogenasa Hom (EC 1.1.1.3), |
| | 17) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homoserina O-acetiltransferasa MetX (EC 2.3.1.31), |
| 35 | 18) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homoserina O-succiniltransferasa MetA (EC 2.3.1.46), |

- 19) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una cistationina gamma-sintasa MetB (EC 2.5.1.48),
- 20) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una β -C-S-liasas AecD (EC 4.4.1.8, también llamada beta-liasas),
- 21) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una cistationina beta-liasas MetC (EC 4.4.1.8),
- 5 22) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homocisteína S-metiltransferasa independiente de B12 MetE (EC 2.1.1.14),
- 23) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de B12 Meth (EC 2.1.1.13),
- 10 24) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una metilentetrahidrofolato reductasa MetF (EC 1.5.1.20),
- 25) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para uno o varios componentes del exportador de L-metionina BrnFE de *Corynebacterium glutamicum*,
- 26) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para uno o varios componentes del exportador de valina YgaZH de *Escherichia coli* (b2682, b2683),
- 15 27) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para el transportador putativo YjeH de *Escherichia coli* (b4141),
- 28) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para uno o varios componentes de la piridina nucleótido transhidrogenasa PntAB (EC 1.6.1.2),
- 29) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una O-succinilhomoserina sulfhidrolasa (EC 2.5.1.48),
- 20 30) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una fosfoenolpiruvato carboxilasa Pyc (EC 4.1.1.31).

En este caso, las características preferentes son una o varias seleccionadas a partir del grupo:

- 1) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para uno o varios componentes del sistema de transporte de tiosulfato/sulfato CysPUWA (EC 3.6.3.25),
- 25 2) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato reductasa CysH (EC 1.8.4.8),
- 3) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para uno o varios componentes der sulfito reductasa CysJI (EC 1.8.1.2),
- 4) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una cisteína sintasa A CysK (EC 2.5.1.47),
- 5) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una cisteína sintasa B CysM (EC 2.5.1.47),
- 30 6) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una serina acetiltransferasa CysE (EC 2.3.1.30),
- 7) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para uno o varios componentes de división de glicina GcvTHP-Lpd (EC 2.1.2.10, EC 1.4.4.2, EC 1.8.1.4),
- 8) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una lipoil sintasa LipA (EC 2.8.1.8),
- 9) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una lipoil-proteína ligasa LipB (EC 2.3.1.181),
- 35 10) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una fosfoglicerato dehidrogenasa SerA (EC 1.1.1.95),

- 11) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una 3-fosfoserin fosfatasa SerB (EC 3.1.3.3),
- 12) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una 3-fosfoserin/fosfohidroxitreonina aminotransferasa SerC (EC 2.6.1.52),
- 13) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una serina hidroximetiltransferasa GlyA (EC 2.1.2.1),
- 5 14) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una aspartoquinasa I y homoserina dehidrogenasa I ThrA (EC 2.7.2.4, EC 1.1.1.3),
- 15) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una aspartato quinasa LysC (EC 2.7.2.4),
- 16) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homoserina-dehidrogenasa Hom (EC 1.1.1.3),
- 17) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homoserina-acetiltransferasa MetX (EC 2.3.1.31),
- 10 18) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homoserina O-trans-succinilasa MetA (EC 2.3.1.46),
- 19) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una cistatión gamma-sintasa MetB (EC 2.5.1.48),
- 20) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una β -C-S-liasa AecD (EC 4.4.1.8, llamada también beta-liasa),
- 21) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una cistationina beta-liasa MetC (EC 4.4.1.8),
- 15 22) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homocisteína S-metiltransferasa independiente de B12 MetE (EC 2.1.1.14),
- 23) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de B12 MetH (EC 2.1.1.13),
- 20 24) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una metilentetrahidrofolato reductasa MetF (EC 1.5.1.20).

En este caso, las características muy especialmente preferentes se seleccionan a partir del grupo:

- 1) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una aspartoquinasa I y homoserina dehidrogenasa I ThrA (EC 2.7.2.4, EC 1.1.1.3),
- 2) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una aspartato quinasa LysC (EC 2.7.2.4),
- 25 3) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homoserina-dehidrogenasa Hom (EC 1.1.1.3),
- 4) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homoserina-acetiltransferasa MetX (EC 2.3.1.31),
- 5) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homoserina O-trans-succinilasa MetA (EC 2.3.1.46),
- 6) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una cistationin gamma-sintasa MetB (EC 2.5.1.48),
- 30 7) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una β -C-S-liasa AecD (EC 4.4.1.8, llamada también beta-liasa),
- 8) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una cistationin beta-liasa MetC (EC 4.4.1.8),
- 9) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una S-metiltransferasa independiente de B12 MetE (EC 2.1.1.14),

10) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de B12 MetH (EC 2.1.1.13),

11) polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una metilentetrahidrofolato reductasa MetF (EC 1.5.1.20).

5 Para la mejora de la producción de L-metionina en *C.glutamicum*, en caso dado es conveniente debilitar uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo:

a) un gen *pgi* que codifica para la glucosa-6-fosfato-isomerasa (Pgi, EC Nr. 5.3.1.9),

b) un gen *thrB* que codifica para la homoserinaquinasa (ThrB, EC Nr. 2.7.1.39),

c) un gen *metK* que codifica para la S-adenosilmetionina sintasa (MetK, EC Nr. 2.5.1.6),

10 d) un gen *dapA* que codifica para la dihidropicolinato sintasa (DapA, EC Nr. 4.2.1.52),

e) un gen *pck* que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Pck, EC Nr. 4.1.1.49),

f) un gen *cg3086* que codifica para la cistationin-γ-liasa (Cg3086, EC Nr. 4.4.1.1),

g) un gen *cg2344* que codifica para la cistationin-β-sintasa (Cg2344, EC Nr. 4.2.1.22),

h) un gen *cg3031* que codifica para la proteína reguladora Cg3031,

15 i) un gen *mcbR* que codifica para el regulador de transcripción de biosíntesis de L-metionina (McbR),

j) un gen *metQ* que codifica para una subunidad del transportador de L-metionina (MetQNI),

k) un gen *metN* que codifica para una subunidad del transportador de L-metionina (MetQNI),

l) un gen *metI* que codifica para una subunidad del transportador de L-metionina (MetQNI),

m) un gen *metP* que codifica para el transportador de L-metionina (MetP).

20 Para la mejora de la producción de L-metionina en *E.coli*, en caso dado es conveniente debilitar uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo:

a) un gen *metJ* que codifica para el regulador de transcripción de la biosíntesis de L-metionina (MetJ) (b3938, ECK3930),

b) un gen *pgi* que codifica para la glucosa-6-fosfato-isomerasa (Pgi, EC Nr. 5.3.1.9) (b4025, ECK4017),

25 c) un gen *thrB* que codifica para la homoserinaquinasa (ThrB, EC 2.7.1.39) (b0003, ECK0003),

d) un gen *metK* que codifica para la S-adenosilmetionina sintasa (MetK, EC Nr. 2.5.1.6) (b2942, ECK2937),

e) un gen *dapA* que codifica para la dihidropicolinato sintasa (DapA, EC Nr. 4.2.1.52) (b2478, ECK2474),

f) un gen *pck* que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Pck, EC Nr. 4.1.1.49) (b3403, ECK3390),

30 g) un gen *purU* que codifica para la formiltetrahidrofolato hidrolasa (PurU, EC Nr. 3.5.1.10) *purU* (b1232, ECK1227),

h) un gen *pykA* que codifica para la piruvato quinasa II (PykA, EC Nr. 2.7.1.40) (b1854, ECK1855)

- i) un gen *pykF* que codifica para la piruvatoquinasa I (PykF, EC 2.7.1.40) (b1676, ECK1672),
- j) un gen *metQ* que codifica para una subunidad del transportador de L-metionina (MetQNI) (b0197, ECK0197),
- 5 k) un gen *metI* que codifica para la subunidad del transportador de L-metionina (MetQNI) (b0198, ECK0198),
- l) un gen *metN* que codifica para la subunidad del transportador de L-metionina (MetQNI) *metN* (b0199, ECK0199),
- m) un gen *dcd* que codifica para la deoxicitidina 5'-trifosfato deaminasa (Dcd, EC Nr. 3.5.4.13) (b2065, ECK2059),
- 10 n) un gen *yncA* que codifica para la N-aciltransferasa putativa (YncA, explorador metabólico WO2010/020681) (b1448, ECK1442),
- o) un gen *fnrS* que codifica para el sARN regulatorio FnrS (b4699, ECK4511).

Descripción detallada de la invención

15 La invención se refiere a un procedimiento para la producción fermentativa de aminoácidos que contienen azufre seleccionados a partir del grupo L-metionina, L-cisteína, L-cistina, L-homocisteína y L-homocistina. El procedimiento se lleva a cabo con un microorganismo de la familia Enterobacteriaceae, o con un microorganismo de la familia Corynebacteriaceae, que sobreexpone un gen que codifica para un polipéptido con la actividad enzimática de una tiosulfato-sulfurotransferasa.

20 El concepto "gen" significa en este caso una sección de ácido desoxirribonucleico (ADN), que contiene las informaciones para la producción (transcripción), en primer lugar, de un ácido ribonucleico (ARN), y éste contiene la información para la producción (traducción) de una proteína (polipéptido), en este caso un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa. El hecho de que un gen o un polinucleótido contenga las informaciones para la producción de una proteína se denomina también codificación de una proteína, o bien de un polipéptido a través del gen, o bien a través del ARN. Se entiende por genes, o bien polinucleótidos endógenos, los genes o alelos, o bien sus polinucleótidos, en la población de un tipo de marcos de lectura abiertos presentes (ORF). Los conceptos "gen" y "ORF" (marco de lectura abierto) se emplean como sinónimo en esta invención.

El concepto "polinucleótido" se refiere en general a polirribonucleótidos y polideoxirribonucleótidos, pudiéndose tratar de ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado.

30 El concepto "polipéptido" designa péptidos o proteínas que contienen dos o más aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos. El concepto polipéptido y proteína se emplean como sinónimos. Las proteínas pertenecen a los componentes básicos. Éstas conceden a la célula no solo estructura, sino que son las "máquinas" moleculares que transportan sustancias, catalizan reacciones químicas e identifican sustancias semioquímicas.

35 Se entiende por "aminoácidos proteinógenos" los aminoácidos que se presentan en proteínas naturales, es decir, en proteínas de microorganismos, plantas, animales y personas. A éstas pertenecen en especial L-aminoácidos seleccionados a partir del grupo ácido L-aspártico, L-asparagina, L-treonina, L-serina, ácido L-glutámico, L-glutamina, glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-prolina y L-arginina, así como selenocisteína. En el caso de los aminoácidos proteinógenos se trata siempre de α -aminoácidos. Excepto el aminoácido glicina, para todos los aminoácidos proteinógenos, el átomo de carbono α es asimétrico (las moléculas son quirales): existen dos enantiómeros de estos aminoácidos. En este caso, solo uno de ambos enantiómeros es proteinógeno, y precisamente el L-aminoácido: el aparato necesario para la síntesis de proteínas – el ribosoma, el tARN, la aminoacil-tARN sintetasa (esta carga el tARN con aminoácidos) y otros – son también quirales en sí mismos, y pueden identificar solo la variante L.

45 El concepto "expresión génica" (abreviado "expresión") designa en general la expresión de la información genética para dar un fenotipo. En sentido más estricto, expresión génica designa la transcripción de un gen a un ARN, la traducción subsiguiente de ARN a un polipéptido, que puede poseer una actividad enzimática.

Bajo el concepto "sobreexpresión" se entiende generalmente un aumento de la concentración intracelular o de la actividad de un ácido ribonucleico, de una proteína o de un enzima en comparación con la cepa de partida (cepa

madre), o cepa de tipo salvaje. En el caso de la presente invención se sobre exprimen genes de tiosulfato-sulfurotransferasa, o bien polinucleótidos, que codifican para un polipéptido de tiosulfato-sulfurotransferasa.

Se entiende por una "cepa de partida" (cepa madre) la cepa de microorganismos en la que se llevan a cabo medidas para el aumento de la productividad de uno o varios aminoácidos, péptidos o proteínas, o bien medidas para el aumento de la actividad de uno o varios enzimas (por ejemplo una medida que impulsa la sobreexpresión). En el caso de una cepa de partida se puede tratar de una cepa de tipo salvaje, pero también de una cepa ya modificada previamente (a modo de ejemplo una cepa de producción).

Se entiende por un "tipo salvaje" de una célula preferentemente una célula cuyo genoma se presenta en un estado como el producido naturalmente mediante la evolución. El concepto se emplea tanto para la célula total, como también para diferentes genes. Por lo tanto, no corresponden al concepto "tipo salvaje" en especial aquellas células, o bien aquellos genes cuyas secuencias génicas se han modificado al menos parcialmente por el hombre mediante procedimientos recombinantes.

Los mutantes obtenidos en el sentido de esta invención muestran una secreción, o bien producción de aminoácidos deseados en un proceso de fermentación, incrementada en comparación con la cepa de partida, o bien cepa madre empleada. En este caso, los aminoácidos se liberan en el medio que los rodea, o bien se acumulan en el interior de la célula (acumulación).

El concepto "intensificación" o "actividad elevada" describe en este contexto el aumento de la actividad enzimática intracelular de uno o varios enzimas en un microorganismo, que se codifican mediante el correspondiente ADN.

En principio, se puede obtener un aumento de la actividad enzimática, a modo de ejemplo, aumentándose el número de copias de la secuencia génica, o bien de las secuencias génicas que codifican para el enzima, empleándose un promotor fuerte o utilizándose un gel o alelo que codifica para un correspondiente enzima con actividad acrecentada, y combinándose estas medidas en caso dado. Se generan células modificadas mediante técnica génica según la invención, a modo de ejemplo, mediante transformación, transducción, conjugación, o una combinación de estos métodos, con un vector que contiene el gen deseado, un alelo de este gen, o partes del mismo, y un vector que posibilita la expresión del gen. La expresión heteróloga se obtiene en especial mediante integración del gen o de los alelos en el cromosoma de la célula, o un vector extracromosómico replicante.

El documento DE-A-100 31 999, que se introduce en el presente documento como referencia, y cuyo contenido divulgativo respecto a las posibilidades de aumento de actividad enzimática en células forma una parte de la manifestación de la presente invención, ofrece una recopilación sobre las posibilidades de aumento de la actividad enzimática en células en el ejemplo de piruvato-carboxilasa.

El aumento de la actividad enzimática se puede obtener, a modo de ejemplo, aumentándose el número de copias de los correspondientes polinucleótidos en al menos una copia a nivel cromosómico o extracromosómico.

Un método bastante extendido para el aumento del número de copias consiste en incorporar el correspondiente polinucleótido en un vector, preferentemente un plásmido, que se replica por una bacteria.

Vectores de plásmido apropiados para Enterobacteriaceae son, por ejemplo, vectores de clonación derivados de pACYC184 (Bartolome et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) o derivados de pSC101 (Vocke und Bastia; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80(21): 6557-6561 (1983)). Además son especialmente apropiados plásmidos derivados de pCL1920 (Lerner, C.G. and Inouye, M., Nucl. Acids Res. (1990) 18:4631 [PMID: 2201955]). Vectores de plásmido derivados de "Bacterial Artificial Chromosomes" (BAC), como por ejemplo pCC1BAC (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, U.S.A.), son igualmente apropiados para aumentar el número de copias de los correspondientes polinucleótidos en *E. coli*.

Vectores de plásmido apropiados para *C. glutamicum* son, a modo de ejemplo, pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology 64: 549-554 (1989)), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 107: 69-74 (1991)) o pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)). Éstos se basan en los plásmidos crípticos pHM1519, pBL1 o pGA1. Del mismo modo se pueden emplear otros vectores de plásmido, como por ejemplo aquellos que se basan en pCG4 (US 4,489,160) o pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66: 119-124 (1990)) o pAG1 (US 5,158,891). También en Tauch et al. (Journal of Biotechnology 104, 27-40 (2003)) se encuentra un artículo recopilatorio sobre el tema plásmidos en *C. glutamicum*.

Además se pueden emplear como vectores transposones, elementos de inserción (elementos IS) o fagos. Tales sistemas genéticos se describen, a modo de ejemplo, en las solicitudes de patente US 4,822,738, US 5,804,414 y US 5,804,414. Del mismo modo se puede emplear el elemento IS IsaBI descrito en el documento WO 92/02627, o el

transposón Tn 45 del plásmido pXZ10142 (citado en el "Handbook of Corynebacterium glutamicum" (editor: L. Eggeling y M. Bott)).

Otro método extendido para la consecución de una sobreexpresión es el procedimiento de amplificación génica cromosómica. En este método se inserta al menos una copia adicional del polinucleótido que interesa en el cromosoma de una bacteria. Tales procedimientos de amplificación se describen, a modo de ejemplo, en el documento WO 03/014330 o el documento WO 03/040373.

Otro método para la consecución de una sobreexpresión consiste en enlazar el correspondiente gen, o bien alelo, de modo funcional (operably linked) con un promotor, o bien un cassette de expresión. Promotores apropiados para *C. glutamicum* se describen, a modo de ejemplo, en la fig. 1 del artículo recopilatorio de Patek et al. (Journal of Biotechnology 104(1-3), 311-323 (2003)). Del mismo modo se pueden emplear las variantes del promotor *dapA* descritas por Vasicova et al (Journal of Bacteriology 181, 6188-6191 (1999)), a modo de ejemplo el promotor A25. Además se puede emplear el promotor *gap* de *C. glutamicum* (EP 06007373).

Para *E. coli* son conocidos, por ejemplo, los promotores T3, T7, SP6, M13, *lac*, *tac* y *trc* descritos por Amann et al. (Gene 69(2), 301-315 (1988)) y Amann y Brosius (Gene 40(2-3), 183-190 (1985)), que se pueden emplear parcialmente también para *C. Glutamicum*. Tal promotor se puede insertar, a modo de ejemplo, en línea de entrada del gen respectivo, típicamente a una distancia de aproximadamente 1 – 500 nucleobases del codón inicial. En el documento US 5,939,307 se describe que, mediante incorporación de cassettes de expresión o promotores, como por ejemplo promotor *tac*, promotor *trp*, promotor *ipp* o promotor PL y promotor PR del fago λ , a modo de ejemplo en línea de entrada del operón de treonina cromosómico, se pudo obtener un aumento de la expresión. Del mismo modo se pueden emplear los promotores del fago T7, los promotores *gear-box* o el promotor *nar*. Tales cassettes de expresión o promotores se pueden emplear también para, como se describe en el documento EP 0 593 792, sobreexpresar genes unidos a plásmido. Mediante empleo del alelo *lacIQ* se puede controlar a su vez la expresión de genes unidos a plásmido (Glascok und Weickert, Gene 223, 221-231 (1998)). Además es posible que la actividad de los promotores esté incrementada mediante modificación de su secuencia por medio de una o varias sustituciones de nucleótidos, mediante inserción (inserciones) y/o delección (delecciones).

Mediante las medidas de sobreexpresión, la actividad o concentración del correspondiente polipéptido se aumenta generalmente en al menos un 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o un 500%, como máximo hasta un 1000% o un 2000%, referido a la actividad o concentración de polipéptido en la correspondiente cepa de partida (microorganismo de tipo salvaje o de partida) antes de la medida que conduce a la sobreexpresión.

Se describen métodos para la determinación de la actividad enzimática, por ejemplo, en Cheng H, Donahue JL, Battle SE, Ray WK, Larson TJ, 2008, Open Microbiol J., 2:18-28, y en Alexander K., Volini M, 1987, J. Biol. Chem., 262: 6595-6604.

La expresión de los enzimas, o bien genes citados anteriormente, es identificable con ayuda de separación en gel de proteínas de 1 y 2 dimensiones, y subsiguiente identificación óptica de la concentración de proteínas con un correspondiente software de valoración en el gel. Si el aumento de una actividad enzimática se basa exclusivamente en un aumento de la expresión del correspondiente gen, la cuantificación del aumento de actividad enzimática se puede determinar fácilmente mediante una comparación de las separaciones de proteínas de 1 o 2 dimensiones entre tipo salvaje y célula modificada mediante técnica génica. Un método de uso común para la preparación de los geles de proteínas en bacterias y para la identificación de las proteínas es el modo de proceder descrito por Hermann et al. (Electrophoresis, 22: 1712-23 (2001)). La concentración de proteínas se puede analizar igualmente mediante hibridación Western-Blot con un anticuerpo específico para la proteína a identificar (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989), y subsiguiente valoración óptica con un correspondiente software para la determinación de la concentración (Lohaus und Meyer (1989) Biospektrum, 5: 32-39; Lottspeich (1999), Angewandte Chemie 111: 2630-2647). La actividad de proteínas enlazantes de ADN se puede medir por medio de ensayos de desplazamiento de banda de ADN (también llamado retardación de gel) (Wilson et al. (2001) Journal of Bacteriology, 183: 2151-2155). La acción de proteínas enlazantes de ADN sobre la expresión de otros genes se puede identificar mediante diversos métodos de ensayo de gen reportero convenientemente conocidos (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989). Las actividades intracelulares enzimáticas se pueden determinar según diversos métodos descritos (Donahue et al. (2000) Journal of Bacteriology 182 (19): 5624-5627; Ray et al. (2000) Journal of Bacteriology 182 (8) : 2277-2284; Freedberg et al. (1973) Journal of Bacteriology 115 (3): 816-823). En tanto en las siguientes explicaciones no se indiquen métodos concretos para la determinación de la actividad de un enzima determinado, la determinación del aumento de la actividad enzimática, y también la determinación de la reducción de la actividad enzimática, se efectúan por medio de los métodos descritos en Hermann et al., Electrophoresis, 22: 1712-23 (2001), Lohaus et al., Biospektrum 5 32-39 (1998), Lottspeich, Angewandte Chemie 111: 2630-2647 (1999) y Wilson et al., Journal of Bacteriology 183: 2151-2155 (2001).

Si el aumento de la actividad enzimática se realiza mediante mutación del gen endógeno, tales mutaciones se

pueden generar según métodos clásicos de forma no selectiva, como por ejemplo mediante irradiación UV o mediante productos químicos mutagénicos, o de manera selectiva por medio de métodos de tecnología génica, como delección (deleciones), inserción (inserciones) y/o intercambio(s) de nucleótidos. Mediante estas mutaciones se obtienen células modificadas a través de técnica génica. Mutantes de enzimas especialmente preferentes son también aquellos enzimas que ya no se pueden inhibir, o que se pueden inhibir en retroalimentación al menos de manera reducida en comparación con el enzima de tipo salvaje.

Si el aumento de la actividad enzimática se realiza mediante aumento de la expresión de un enzima, de este modo se aumenta, a modo de ejemplo, el número de copias de los correspondientes genes, o se muta la región de promotor y de regulación, o el punto de enlace ribosómico, que se encuentra en línea de entrada del gen estructural. Del mismo modo actúan los cassettes de expresión que se incorporan en línea de entrada del gen estructural. Mediante promotores inducibles es posible adicionalmente aumentar la expresión en cualquier momento. Por lo demás, al gen enzimático se pueden asignar como secuencias reguladoras también los denominados "potenciadores", que ocasionan igualmente una expresión génica elevada a través de una interacción mejorada entre ARN-polimerasa y ADN. Mediante medidas para la prolongación del período de vida de mRNA se mejora igualmente la expresión. Además, mediante inhibición de la degradación de la proteína enzimática se intensifica igualmente la actividad enzimática. Los genes o estructuras génicas se presentan en este caso en plásmidos con diferente número de copias, o bien están integrados y amplificados en el cromosoma. Alternativamente, se puede conseguir una sobreexpresión de los respectivos genes mediante modificación de la composición del medio y control de cultivo. El especialista encuentra instrucciones a tal efecto, entre otros, en Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), en Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), en Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), en el documento EP-A-0 472 869, en el documento US 4,601,893, en Schwarzer y Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), en Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), en LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), en el documento WO-A-96/15246, en Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), en el documento JP-A-10-229891, en Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), y en conocidos libros de texto de genética y biología molecular. Las medidas descritas anteriormente, al igual que las mutaciones, conducen a células modificadas mediante técnica génica.

Además, también son apropiados aquellos vectores de plásmido, con cuya ayuda se puede aplicar el procedimiento de amplificación génica mediante integración en el cromosoma, como se describió, a modo de ejemplo, por Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60: 126-132 (1994)) para la duplicación, o bien amplificación del operón *hom-thrB*. En este método, el gen completo se clona en un vector de plásmido, que se puede replicar en un huésped (típicamente *Escherichia coli*), pero no en *Corynebacterium glutamicum*. Como vectores entran en consideración, a modo de ejemplo, pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1: 784-791 (1983)), pK18mob o pK19mob (Schäfer et al., Gene 145: 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman, Journal of Biological Chemistry 269: 32678-84 (1994)), pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Groningen, Niederlande), pEM1 (Schumpf et al., Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) o pBGS8 (Spratt et al., Gene 41: 337-342 (1986)). El vector de plásmido, que contiene el gen a amplificar, se transforma a continuación en la cepa de *Corynebacterium glutamicum* deseada mediante conjugación o transformación. El método de conjugación se describe, a modo de ejemplo, en Schäfer et al., Applied and Environmental Microbiology 60: 756-759 (1994). Se describen métodos para la transformación, a modo de ejemplo, en Thierbach et al., Applied Microbiology and Biotechnology 29: 356-362 (1988), Dunican und Shivnan, Bio/Technology 7: 1067-1070 (1989) y Tauch et al., FEMS Microbiology Letters 123: 343-347 (1994). Tras recombinación homóloga por medio de un fenómeno "cross-over", la cepa resultante contiene al menos dos copias del gen en cuestión. Se describe un procedimiento similar para *E. Coli*, a modo de ejemplo, en Link, A.J., Phillips, D. and Church, G.M. (1997), J. Bacteriology 179: 6228-6237.

Para la inserción o delección de ADN en el cromosoma se pueden emplear también procedimientos mediados por recombinasa, como se describieron, a modo de ejemplo, por Datsenko KA, Wanner BL., 2000, Proc Natl Acad Sci U S A., 97(12):6640-5.

Bajo la formulación "una actividad de un enzima acrecentada frente a su cepa de tipo salvaje, o bien cepa de partida", empleada anteriormente y en las siguientes explicaciones, se entiende siempre, de modo preferente, una actividad del respectivo enzima acrecentada en un factor de al menos 2, de modo especialmente preferente de al menos 10, además preferentemente de al menos 100, además de modo aún más preferente de al menos 1000, y del modo más preferente de al menos 10000. Además, la célula según la invención, que presenta "una actividad de un enzima acrecentada frente a su cepa de tipo salvaje, o bien cepa de partida", comprende en especial también una célula, cuya cepa de tipo salvaje, o bien de partida, no presenta actividad, o al menos no presenta una actividad identificable de este enzima, y que presenta una actividad identificable de este enzima solo tras aumento de la actividad enzimática, a modo de ejemplo mediante sobreexpresión. En este contexto, el concepto "sobreexpresión", o la formulación "aumento de la expresión" empleada en las siguientes explicaciones, comprende también el caso en el que una célula de partida, a modo de ejemplo una célula de tipo salvaje, no presenta una expresión, o al menos no presenta una expresión identificable, y solo mediante procedimientos recombinantes se induce una expresión identificable del enzima.

Las bacterias aisladas obtenidas mediante las medidas de la invención muestran una secreción, o bien producción de los aminoácidos deseados en un proceso de fermentación, incrementada en comparación con la cepa de partida, o bien cepa madre empleada.

- 5 Se debe entender por bacterias aisladas los mutantes según la invención, aislados, o bien generados, y bacterias recombinantes, en especial de la familia Enterobacteriaceae o Corynebacteriaceae, que presentan una actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa elevada frente a la cepa de partida.

- 10 El rendimiento de las bacterias aisladas, o bien del proceso de fermentación bajo empleo de las mismas, respecto a uno o varios de los parámetros seleccionados a partir del grupo de concentración de producto (producto por volumen), de rendimiento de producto (producto formado por fuente de carbono consumida) y de la formación de producto (producto formado por volumen y tiempo), o también otros parámetros de proceso y combinaciones de los mismos, se mejora al menos en un 0,5 %, al menos en un 1 %, al menos en un 1,5 %, o al menos en un 2 %, referido a la cepa de partida, o bien cepa madre, o bien al proceso de fermentación, bajo empleo del mismo.

- 15 En el procedimiento según la invención, las bacterias se pueden cultivar continuamente – como se describe, a modo de ejemplo, en el documento PCT/EP2004/008882 – o de manera discontinua en el procedimiento discontinuo (cultivo por cargas), o en el procedimiento por cargas de alimentación (procedimiento de alimentación), o en el procedimiento por cargas de alimentación reiteradas (procedimiento de alimentación repetitivo), con el fin de la producción de L-aminoácidos. Se encuentra disponible un resumen de tipo general sobre métodos de cultivo conocidos en el manual de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el manual de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) verfügbar.

El medio de cultivo, o bien el medio de fermentación a emplear, debe cumplir adecuadamente los requisitos de las respectivas cepas. El libro de consulta "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) contiene descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos. Los conceptos medio de cultivo y medio de fermentación, o bien medio, son intercambiables.

- 25 Como fuente de carbono se pueden emplear azúcares e hidratos de carbono, como por ejemplo glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, disoluciones que contienen sacarosa de la producción de remolacha azucarera y caña de azúcar, almidón, hidrolizado de almidón y celulosa, aceites y grasas, como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos, como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, como por ejemplo glicerina, metanol y etanol, y ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido acético. Estas sustancias se pueden emplear por separado o como mezcla.

Como fuente de nitrógeno se pueden emplear compuestos orgánicos nitrogenados, como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, agua de remojo de maíz, harina de habas de soja y urea, o compuestos inorgánicos, como sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico y nitrato amónico. Las fuentes de nitrógeno se pueden emplear por separado o como mezcla.

- 35 Como fuente de fósforo se pueden emplear ácido fosfórico, dihidrogenofosfato potásico o hidrogenofosfato dipotásico, o las correspondientes sales que contienen sodio.

Como fuente de carbono, según la invención se emplea una sal de ácido tiosulfúrico (tiosulfato), en caso dado junto con otras fuentes de azufre, como por ejemplo sulfato, sulfito o ditionita.

- 40 El medio de cultivo debe contener además sales, a modo de ejemplo en forma de cloruros, de metales, como por ejemplo sodio, potasio, magnesio, calcio y hierro, como por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarios para el crecimiento. Finalmente se pueden emplear sustancias de crecimiento esenciales, como aminoácidos, a modo de ejemplo homoserina, y vitaminas, a modo de ejemplo tiamina, biotina o ácido pantoténico, adicionalmente a las sustancias citadas con anterioridad. Al medio de cultivo se pueden añadir además precursores apropiados de los respectivos aminoácidos.

- 45 Las citadas sustancias de empleo se pueden añadir al cultivo en forma de una carga única, o alimentar de modo apropiado durante el cultivo.

- 50 Para el control de pH del cultivo se emplean compuestos básicos, como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco, o bien agua amoniacal, o compuestos ácidos, como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, de modo apropiado. El pH se ajusta en general a un valor de 6,0 a 9,0, preferentemente 6,5 a 8. Para el control del desarrollo de espuma se pueden emplear antiespumantes, como por ejemplo poliglicolésteres de ácidos grasos. Para el mantenimiento de la estabilidad de plásmidos se pueden añadir al medio sustancias de acción selectiva apropiadas, como por ejemplo antibióticos. Para mantener condiciones aerobias se introducen oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, como por ejemplo aire, en el cultivo. El empleo de líquidos, que están enriquecidos con peróxido de

hidrógeno, es igualmente posible. En caso dado, la fermentación se realiza en sobrepresión, a modo de ejemplo a una presión de 0,03 a 0,2 MPa. La temperatura del cultivo se sitúa normalmente en 20°C a 45°C, y preferentemente en 25°C a 40°C. En el procedimiento discontinuo, se prosigue el cultivo hasta que se ha formado un máximo del aminoácido deseado. Este objetivo se consigue normalmente en el intervalo de 10 horas hasta 160 horas. En el procedimiento continuo son posibles tiempos de cultivo más largo.

Se describen medios de fermentación apropiados, entre otros, en el documento US 6,221,636, en el documento US 5,840,551, en el documento US 5,770,409, en el documento US 5, 605, 818, en el documento US 5, 275, 940 y en el documento US 4,224,409.

Los métodos para la determinación de L-aminoácidos son conocidos por el estado de la técnica. El análisis se puede efectuar, por ejemplo como se describe en Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190), mediante cromatografía de intercambio iónico con subsiguiente derivatización de ninhidrina, o se puede realizar mediante HPCL en fase inversa, como se describe en Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174).

El caldo de fermentación obtenido de este modo se elabora ulteriormente a continuación para dar un producto sólido o líquido.

Se entiende por un caldo de fermentación un medio de fermentación en el que se cultivó un microorganismo durante un cierto tiempo y a una cierta temperatura. El medio de fermentación, o bien los medios empleados durante la fermentación, contiene/contienen todas las sustancias, o bien todos los componentes que aseguran una propagación del microorganismo y una formación del aminoácido deseado.

Al final de la fermentación, el caldo de fermentación producido contiene correspondientemente a) la biomasa del microorganismo producida debido a la propagación de células del microorganismo, b) el aminoácido deseado formado en el transcurso de la fermentación, c) los productos secundarios formados en el transcurso de la fermentación, y d) los componentes no consumidos a través de la fermentación del/de medio de fermentación empleado/medios de fermentación empleados, o bien de las sustancias de empleo, como por ejemplo vitaminas, como biotina, aminoácidos, como homoserina, o sales, como sulfato de magnesio.

A los productos secundarios orgánicos pertenecen sustancias que se generan, y en caso dado se excretan por los microorganismos empleados en la fermentación, además del respectivo L-aminoácido deseado. Entre éstos cuentan L-aminoácidos que constituyen menos de un 30%, un 20% o un 10% en comparación con el aminoácido deseado. Entre éstos cuentan además ácidos orgánicos, que portan uno a tres grupos carboxilo, como por ejemplo ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico o ácido fumárico. Finalmente, a éstos pertenecen también azúcares, como por ejemplo trehalosa.

Los caldos de fermentación apropiados para fines industriales tienen un contenido en aminoácidos de 40 g/kg a 180 g/kg o 50 g/kg a 150 g/kg. El contenido en biomasa (como biomasa desecada) asciende en general a 20 hasta 50 g/kg.

Ejemplos:

Ejemplo 1: síntesis y clonación del gen RDL2

Para la expresión del ORF RDL2 (SEQ ID NO:1) de *S. cerevisiae* se sintetizó *de novo* una secuencia de nucleótido (GENEART AG; Regensburg, Alemania), que está constituida por una secuencia de línea de entrada ("upstream", SEQ ID NO:6), la secuencia de ORF RDL2 ("RDL2", SEQ ID NO:1), así como por una secuencia de línea de salida ("downstream", SEQ ID NO:7). La secuencia *upstream* contiene secuencias de identificación para los enzimas de restricción PacI y FseI, así como un punto de enlace robosómico. La secuencia *downstream* contiene un segundo codón de parada TAA, seguido del terminador T1 del gen *mpB* de *E. coli* MG1655. Después siguen secuencias de identificación para los enzimas de restricción PmeI y SbfI. Tras la síntesis se cortaron las secuencias de nucleótidos con SacI y KpnI, y se clonaron en el plásmido pMA (ampR), igualmente cortado con SacI y KpnI. El plásmido resultante se caracterizó con "pMA-RDL2" (SEQ ID NO:8, figura 1).

Partiendo de la secuencia de aminoácidos de la proteína Rdl2p codificada por el ORF RDL2 (secuencia "RDL2p", SEQ ID NO:2) se generaron tres secuencias de ADN diferentes, que codifican para proteínas Rdl2p con secuencia de aminoácidos de tipo salvaje. Las secuencias se caracterizaron con "RDL2a" (SEQ ID NO:3), "RDL2b" (SEQ ID NO:4) y "RDL2c" (SEQ ID NO:5). Estas tres secuencias se sintetizaron *de novo*, en cada caso junto con las secuencias *upstream* y *downstream* descritas anteriormente, y se clonaron en el plásmido pMA (GENEART AG; Regensburg, Alemania) como se describe anteriormente. Los plásmidos resultantes se caracterizaron con pMA-RDL2a, pMA-RDL2b y pMA-RDL2c. Las citadas variantes se diferencian en la optimización del empleo de codón (codon usage) del microorganismo empleado para el procedimiento. De este modo, los valores para la adaptación al empleo de codón son los siguientes:

RDL2: empleo de codón no adaptado ("codon adaptation index" CAI=0,27)

RDL2a: empleo de codón ligeramente adaptado a *E. coli* (CAI=0,38)

RDL2b: empleo de codón más intensamente adaptado a *E. coli* (CAI=0,72)

RDL2c: empleo de codón completamente adaptado a *E. coli* (CAI=1)

- 5 Ejemplo 2: clonación de ORFs RDL2, RDL2a, RDL2b, así como RDL2c, en el plásmido pME101-*thrA**1-*cysE*-Pgap-*metA**11.

Para la expresión en *E. coli* se clonaron las variantes génicas codificantes para la proteína RDL2 en el plásmido de producción de *E. coli* pME101-*thrA**1-*cysE*-Pgap-*metA**11 (WO2007/ 077041) en línea de salida de *metA**11.

- 10 A tal efecto se amplificaron los genes respectivamente con los cebadores RDL2-t4-f (SEQ ID NO:11) y RDL2-r (SEQ ID NO:12) bajo aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la ADN-polimerasa Phusion (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia). Como matrices sirvieron los plásmidos pMA-RDL2, pMA-RDL2a, pMA-RDL2b y pMA-RDL2c del ejemplo 1.

RDL2-t4-f (SEQ ID NO:11):

5' aggacagtcgacggtaccgcaagcttcgcttcgcACTGGAAAGCGGGCAGTGAG 3'

- 15 RDL2-r (SEQ ID NO:12):

5' AGCGCGACGTAATACGACTC 3'

- 20 Los productos de PCR de 804 bp de tamaño y el plásmido pME101-*thrA**1-*cysE*-Pgap-*metA**11 se disociaron con los enzimas de restricción *Sall* y *SbfI*, se ligaron y se transformaron en la cepa de *E. coli* DH5α. Las células portadoras de plásmido se seleccionaron mediante el cultivo en agar LB con 50 µg/ml de estreptomicina. El buen resultado de clonación se identificó tras el aislamiento del ADN plasmídico mediante la disociación de control con el enzima de restricción *AgeI*. Finalmente se secuenciaron los fragmentos de ADN clonados con los siguientes cebadores:

pME-RDL2-Seqf (SEQ ID NO:13):

5' ATGTGGAAGCCGGACTAGAC 3'

- 25 pME-RDL2-Seqr (SEQ ID NO:14):

5' TCGGATTATCCCGTGACAGG 3'

Los plásmidos producidos de este modo se caracterizaron con pME-RDL2, pME-RDL2a, pME-RDL2b y pME-RDL2c.

Ejemplo 3: transformación de *E.coli* MG1655Δ*metJ* *P_{trc}-metH* *P_{trc}-metF* *P_{trcF}-cysPUWAM* *P_{trcF}-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP*

- 30 La cepa de *E. coli* productora de L-metionina MG1655Δ*metJ* *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}-metF* *P_{trcF}-cysPUWAM* *P_{trcF}-cysJIH* (a continuación caracterizada con DM2219) se describe en el documento WO 2009/043803 A2.

- 35 La cepa se transformó respectivamente con los plásmidos pME-RDL2, pME-RDL2a, pME-RDL2b y pME-RDL2c, así como con el plásmido pME101-*thrA**1-*cysE*-Pgap-*metA**11 (WO2009/043803 A2), y se seleccionaron células portadoras de plásmido en agar LB con 50 µg/ml de estreptomicina. Las células transformadas se sobreinocularon respectivamente en 10ml de medio líquido LB con un 1 % de glucosa y 50 µg/ml de estreptomicina, y se cultivaron 16 h a 37°C. A continuación se añadió glicerina a una concentración final de un 10 %, y se congeló el cultivo a -70°C.

Ejemplo 4: valoración de cepas de producción de L-metionina de *E.coli*

- 40 El rendimiento de las cepas de producción de L-metionina de *E.coli* se valoró mediante ensayos de producción en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Como cultivos previos se inocularon respectivamente 10 ml de medio de cultivo previo (10 % de medio LB con 2,5 g/l de glucosa y un 90 % de medio mínimo PC1) con 100µl de cultivo celular, y se cultivaron 10 horas a 37°C. En este caso se inocularon a continuación en cada caso 10 ml de medio mínimo PC1 (tabla 1) a una OD 600 nm de 0,2 (Eppendorf Bio-Photometer; Eppendorf AG, Hamburg, Alemania), y se cultivaron durante 24 horas a 37°C. La concentración de L-metionina extracelular se determinó con un analizador de

aminoácidos (Sykam GmbH, Eresing, Alemania) mediante cromatografía de intercambio iónico y derivatización en columna subsiguiente con detección de ninhidrina. La concentración de glucosa extracelular se determinó con un YSI 2700 Select Glucose Analyzer (YSI Life Sciences, Yellow Springs, Ohio, USA). Los datos muestran que la expresión de ORF RDL2, RDL2a, RDL2b o RDL2c aumenta claramente la concentración de L-metionina (tabla 2).

5 Tabla 1: medio mínimo PC1

Substancia	Concentración
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	4 mg/l
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	2 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	20 mg/l
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	8 mg/l
H ₃ BO ₃	1 mg/l
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,4 mg/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1 g/l
Ácido cítrico * 1 H ₂ O	6,56 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	40 mg/l
K ₂ HPO ₄	8,02 g/l
Na ₂ HPO ₄	2 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8 g/l
NH ₄ Cl	0,13 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₃	5,6 g/l
MOPS	5 g/l
NaOH 10M	ajustado a pH 6,8
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	40 mg/l
Hidrocloreuro de tiamina	10 mg/l
Vitamina B12	10 mg/l
Glucosa	10 g/l

Substancia	Concentración
Isopropil-tio- β -galactósido (IPTG)	2,4 mg/l
Espectinomicina	50 mg/l

Tabla 2: concentraciones de L-metionina en los caldos de fermentación de las diversas cepas portadoras de plásmido de *E. coli* DM2219

Cepa	Plásmido	OD (600nm)	L-metionina (g/l)
DM2219	pME101-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11	7,51	0,43
DM2219	pME-RDL2	7,59	0,51
DM2219	pME-RDL2a	7,72	0,53
DM2219	pME-RDL2b	7,50	0,52
DM2219	pME-RDL2c	7,64	0,54

5 Ejemplo 5: clonación de los ORFs RDL2, RDL2a, RDL2b, así como RDL2c en el plásmido pEC-XT99A.

Como vector base para la expresión de los ORFs RDL2, RDL2a, RDL2b, así como RDL2c en *C. glutamicum* se empleó el plásmido de expresión transporte de *E. coli*-*C. glutamicum* pEC-XT99A (EP1085094B1). Los plásmidos pMA-RDL2, pMA-RDL2a, pMA-RDL2b y pMA-RDL2c del ejemplo 1 se disociaron respectivamente con los enzimas de restricción *Stu*I y *Nae*I, y se separaron en un gel de agarosa al 0,8 %. Los fragmentos de ADN de 638 bp de tamaño se cortaron a partir del gel, y se extrajo el ADN (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden, Alemania). El plásmido de expresión pEC-XT99A se disoció con el enzima de restricción *Ecl*136II. A continuación se ligó el mismo respectivamente con los fragmentos de ADN de 638 de tamaño, bajo empleo del kit de ligamiento Ready-To-Go (Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania). La cepa de *E. coli* DH5 α (Invitrogen GmbH; Darmstadt; Alemania) se transformó con las cargas de ligamiento y se seleccionaron las células portadoras de plásmido en agar LB con 5 μ g/ml de tetraciclina.

Tras el aislamiento del ADN plasmídico, el buen resultado de la clonación se identificó mediante una disociación de control con los enzimas de restricción *Pme*I y *Sac*II. Finalmente se secuenciaron los plásmidos con los siguientes cebadores:

pECf (SEQ ID NO:9):
5' TACTGCCGCCAGGCAAATTC 3'

pECr (SEQ ID NO:10):
5' TTTGCGCCGACATCATAACG 3'

Las estructuras plasmídicas en las que el promotor *tcr* propio del plásmido y los ORFs codificantes para RDL2 presentan la misma orientación se caracterizaron de la siguiente manera: pEC-RDL2, pEC-RDL2a, pEC-RDL2b y pEC-RDL2c.

Ejemplo 6: transformación de *C. glutamicum* M1179

La cepa *Corynebacterium glutamicum* M1179 es un productor de L-metionina resistente a etionina (WO2007/011939). Ésta se depositó en la Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ,

Braunschweig, Alemania) en la fecha 18.5.2005, de conformidad con el Tratado de Budapest como DSM17322.

Los plásmidos pEC-RDL2, pEC-RDL2a, pEC-RDL2b, pEC-RDL2c, o bien pEC-XT99A, se electroporaron según condiciones de electroporación de Tauch et al. (1994, FEMS Microbiological Letters, 123: 343-347) en la cepa M1179.

- 5 La selección de células portadoras de plásmido se efectuó en agar LB con 5µg/ml de tetraciclina. El ADN plasmídico de las células transformadas se aisló (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology 144, 915-927) y se analizó mediante disociación de restricción y electroforesis en gel. Las cepas producidas de este modo se caracterizaron con M1179/pEC-RDL2, M1179/pEC-RDL2a, M1179/pEC-RDL2b, M1179/pEC-RDL2c y M1179/pEC-XT99A.

Ejemplo 7: valoración de las cepas de producción de L-metionina de *C. glutamicum*

- 10 Las cepas de *C. glutamicum* M1179/pEC-RDL2, M1179/pEC-RDL2a, M1179/pEC-RDL2b, M1179/pEC-RDL2c y M1179/pEC-XT99A producidas se cultivaron en un medio nutriente apropiado para la producción de L-metionina, y se determinó el contenido en L-metionina en el exceso de cultivo.

- 15 A tal efecto, las cepas se extendieron en primer lugar sobre placas de agar (agar cerebro corazón con canamicina (25 mg/l)), y se incubaron 24 horas a 33°C. De estos cultivos en placas de agar se sobreinocularon células respectivamente en 10 ml de medio HH (Hirn-Herz Bouillon, Merck, Darmstadt, Alemania) con 5 mg/l de tetraciclina, y se agitaron 24 horas en matraces Erlenmeyer de 100 ml a 33°C con 240 rpm. En este caso se inocularon a continuación, en cada caso, 10 ml de medio PM (tabla 3) a una OD 660 nm de 0,1 (Genios, Tecan Alemania GmbH, Crailsheim, Alemania), y se cultivaron durante 24 h a 33°C en matraces Erlenmeyer de 100 ml con deflectores.

Tabla 3: medio PM

Substancia	Concentración
Glucosa	50 g/l
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	10 g/l
(NH ₄)Cl	10 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,4 g/l
KH ₂ PO ₄	0,6 g/l
Extracto de levadura (Difco)	10 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	2 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	2 mg/l
Agua amoniacal	ajustado a pH 7,8
Tiamina * HCl	1 mg/l
Vitamina B12	0,2 mg/l
Biotina	0,1 mg/l
Piridoxina * HCl (vitamina B6)	5 mg/l

Substancia	Concentración
Treonina	238 mg/l
CaCO ₃	50 g/l
Tetraciclina	5 mg/l
Isopropil-tio- β -galactósido (IPTG)	1 mM

5 Después de 24 horas se determinó la OD a 660 nm (Genios, Tecan Alemania GmbH, Crailsheim, Alemania) y se midió la concentración de L-metionina formada. Se determinó L-metionina con un analizador de aminoácidos (Sykam GmbH, Eresing, Alemania) mediante cromatografía de intercambio iónico y derivatización en columna subsiguiente con detección de ninhidrina. La tabla 4 muestra las densidades ópticas y las concentraciones de L-metionina de los cultivos. La expresión de ORF RDL2, RDL2a, RDL2b o RDL2c conlleva un claro aumento de la concentración de L-metionina.

Tabla 4: concentraciones de metionina en los caldos de cultivo de diversas cepas portadoras de plásmido de *C. glutamicum* M1179

Cepa	OD (600nm)	L-metionina (g/l)
M1179/pEC-XT99A	25,7	0,47
M1179/pEC-RDL2	25,8	0,50
M1179/pEC-RDL2a	24,1	0,50
M1179/pEC-RDL2b	26,2	0,55
M1179/pEC-RDL2c	24,5	0,54

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Evonik Degussa GmbH	
	<120> Procedimiento para la producción fermentativa de aminoácidos que contienen azufre	
5	<130> 201000424	
	<160> 14	
	<170> PatentIn version 3.3	
10	<210> 1	
	< 211> 450	
	< 212> ADN	
	< 213> Saccharomyces cerevisiae	
	<400> 1	
	atgttcaagc atagtacagg tattctctcg aggacagttt ctgcaagatc gcctacattg	60
	gtcctgagaa catttacaac gaaggctcca aagatctata cttttgacca ggtcaggaac	120
	ctagtcgaac accccaatga taaaaaacta ttggtagatg taagggaacc caaggaagta	180
	aaggattaca agatgccaac tacaataaat attccggtga atagtgcccc tggcgctctt	240
	ggattgcccc aaaaggagtt tcacaaaagtt ttccaatttg ctaaaccacc tcacgataaa	300
	gaattgatatt ttctttgtgc gaaaggagta agagccaaaa ctgccgaaga gttggctcga	360
	tcttatgggt acgaaaacac tggatatctat cctggttcta ttactgagtg gttagctaaa	420
	ggtggtgctg acgttaagcc caaaaaataa	450
15	<210> 2	
	< 211> 149	
	< 212> PRT	
	< 213> Saccharomyces cerevisiae	
	<400> 2	
	Met Phe Lys His Ser Thr Gly Ile Leu Ser Arg Thr Val Ser Ala Arg	
	1 5 10 15	
	Ser Pro Thr Leu Val Leu Arg Thr Phe Thr Thr Lys Ala Pro Lys Ile	
	20 25 30	
	Tyr Thr Phe Asp Gln Val Arg Asn Leu Val Glu His Pro Asn Asp Lys	
	35 40 45	
	Lys Leu Leu Val Asp Val Arg Glu Pro Lys Glu Val Lys Asp Tyr Lys	
	50 55 60	
	Met Pro Thr Thr Ile Asn Ile Pro Val Asn Ser Ala Pro Gly Ala Leu	
	65 70 75 80	

20

ES 2 651 631 T3

Gly Leu Pro Glu Lys Glu Phe His Lys Val Phe Gln Phe Ala Lys Pro
85 90 95

Pro His Asp Lys Glu Leu Ile Phe Leu Cys Ala Lys Gly Val Arg Ala
100 105 110

Lys Thr Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Tyr Glu Asn Thr Gly
115 120 125

Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Thr Glu Trp Leu Ala Lys Gly Gly Ala Asp
130 135 140

Val Lys Pro Lys Lys
145

<210> 3
< 211> 450
< 212> ADN
< 213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 3
atgttcaaac acagcaccgg tattctgtct cgtacagttt cagcacgcag tccgacttta 60
gtgcttcgga cctttacaac gaaagcccct aagatctata cttttgatca ggtccgaaat 120
ctggtagaac atccaaacga caaaaagttg ctcggtgatg tgagagaacc caaagaggtc 180
aaagattaca aaatgccgac caccgataaat attccagttta actccgctcc gggagcgctg 240
ggcctacctg aaaaagagtt tcataaggta tttcagttcg caaaaccgcc tcatgacaaa 300
gaactgatct tcttatgtgc caaggggggtg cgtgcgaaaa cagcagagga acttgctcgc 360
tcgtatggtt atgaaaatac aggtattttac ccaggcagca taactgagtg gctggccaaa 420
gggggagcgg atgttaaacc caaaaagtaa 450

<210> 4
< 211> 450
< 212> ADN
< 213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 4
atgtttaaac attccactgg cattttgtcc cgtaccgtat cagcccgttc tccgaccctt 60
gtcctgcgta ccttcactac caaagctccc aaaatctata cctttgacca ggtgcgcaac 120
ctggttgaac atccgaacga taaaaaactg ctcgtagacg tccgtgaacc gaaagaagtg 180
aaagactaca aaatgccaac tactattaat atcccgggtta acagcgcgcc ggggtgctctt 240
ggctctgccg aaaaagaatt ccacaaaagta ttccagttcg ctaaaaccgcc gcacgacaaa 300
gaactgattt tcttatgcgc gaaggggtgtg cgtgctaaaa ccgcggaaga actggctcgt 360
tcttacgggt acgaaaacac cggcatttat ccgggctcta tcaccgaatg gctggcgaaa 420
gggtgtgctg atgtgaagcc gaagaaataa 450

<210> 5
< 211> 450
< 212> ADN
< 213> Saccharomyces cerevisiae

ES 2 651 631 T3

	<400> 5 atgttcaaac actctaccgg tatcctgtct cgtaccgttt ctgcgcgttc tccgaccctg 60
	gttctgcgta ccttcaccac caaagcgccg aaaatctaca ccttcgacca ggttcgtaac 120
	ctggttgaac acccgaacga caaaaaactg ctggttgacg ttcgtgaacc gaaagaagtt 180
	aaagactaca aaatgccgac caccatcaac atcccggtta actctgcgcc ggggtgcgctg 240
	ggctctgccg aaaaagaatt ccacaaaagt ttccagttcg cgaaaccgcc gcacgacaaa 300
	gaactgatct tcctgtgcgc gaaaggtgtt cgtgcgaaaa ccgcggaaga actggcgcgt 360
	tcttacggtt acgaaaacac cggtatctac ccgggttcta tcaccgaatg gctggcgaaa 420
	gggtgtgcgg acgttaaacc gaaaaataa 450
5	<210> 6 < 211> 58 < 212> ADN < 213> Secuencia sintética
	<400> 6 ggtacctaa ttaagtgat tcgaggccgg ccacgagtac tattaaagag gagaaata 58
10	<210> 7 < 211> 144 < 212> ADN < 213> Secuencia sintética
	<400> 7 taaccggctt atcggtcagt ttcacctgat ttacgtaaaa acccgcttcg gcgggttttt 60
	gcttttgag gggcagaaag atgaatgact gtccacgacg ctatacccaa aagaaagttt 120
	aaacgcatac cctgcaggga gctc 144
15	<210> 8 < 211> 3010 < 212> ADN < 213> Secuencia sintética
	<400> 8 ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc 60
	attttttaac caataggccg aaatcgcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
	gatagggttg agtggccgct acagggcgct cccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt 180
	gggaaggcg tttcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt 240
20	gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca ggggtttccc agtcacgacg ttgtaaaacg 300

ES 2 651 631 T3

acggccagtg agcgcgacgt aatacgactc actatagggc gaattggcgg aaggccgtca 360
 aggcctaggc gcgccatgag ctccctgcag ggtatgcgtt taaactttct tttgggtata 420
 gcgctcgtga cagtcattca tctttctgcc cctccaaaag caaaaacccg ccgaagcggg 480
 tttttacgta aatcagggtga aactgaccga taagccgggtt attatTTTTT gggcttaacg 540
 tcagcaccac ctttagctaa ccactcagta atagaaccag gatagatacc agtgTTTTcg 600
 tacccataag atcgagccaa ctcttcggca gttttggctc ttactccttt cgcacaaaga 660
 aaaatcaatt ctttatcgtg aggtgggtta gcaaattgga aaactttgtg aaactccttt 720
 tcgggcaatc caagagcgcc aggggcacta ttcaccggaa tatttattgt agttggcatc 780
 ttgtaatcct ttacttcctt gggttccctt acatctacca atagTTTTTT atcattgggg 840
 tgttcgacta ggttcctgac ctggtcaaaa gtatagatct ttggagcctt cgttgtaaatt 900
 gttctcagga ccaatgtagg cgatcttgca gaaactgtcc tcgagagaat acctgtacta 960
 tgcttgaaca ttatttctcc tctttaatag tactcgtggc cggcctcgaa tccacttaat 1020
 taaggtagct ctttaattaac tggcctcatg ggccttccgc tcaactgccg ctttccagtc 1080
 gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaaca tggcatagc tgtttccttg cgtattgggc 1140
 gctctccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcgggtaa agcctggggt 1200
 gcctaataag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 1260
 tttttccata ggctccgcc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 1320
 tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 1380
 cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggataacctg ccgcctttct ccttcggga 1440
 agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc 1500
 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt 1560
 aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaga cacgacttat cgcactggc agcagccact 1620
 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgttg 1680
 cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 1740
 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcgg 1800
 ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 1860
 ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg 1920
 gtcagagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 1980
 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt 2040
 gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc 2100
 gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctg aatgataccg 2160

ES 2 651 631 T3

cgagaaccac gctcacccgc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 2220
gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 2280
gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca 2340
ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga 2400
tcaaggcgag ttacatgata ccccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc cttcggctct 2460
ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 2520
cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 2580
accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 2640
cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 2700
tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact 2760
cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 2820
acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc 2880
atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 2940
tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 3000
aaagtgccac 3010

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia sintética

5

<400> 9
tactgccgcc aggcaattc 20

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia sintética

10

<400> 10
ttgcgccga catcataacg 20

<210> 11
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia sintética

15

<400> 11
aggacagtcg acggtaccgc aagctcggc ttgcactgg aaagcgggca gtgag 55

20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia sintética

25

<400> 12
agcgcgacgt aatacgactc 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN

	< 213> Secuencia sintética	
	<400> 13	
	atgtggaagc cggactagac	20
5	<210> 14	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia sintética	
	<400> 14	
	tcggattatc ccgtgacagg	20
10	201000424 5	

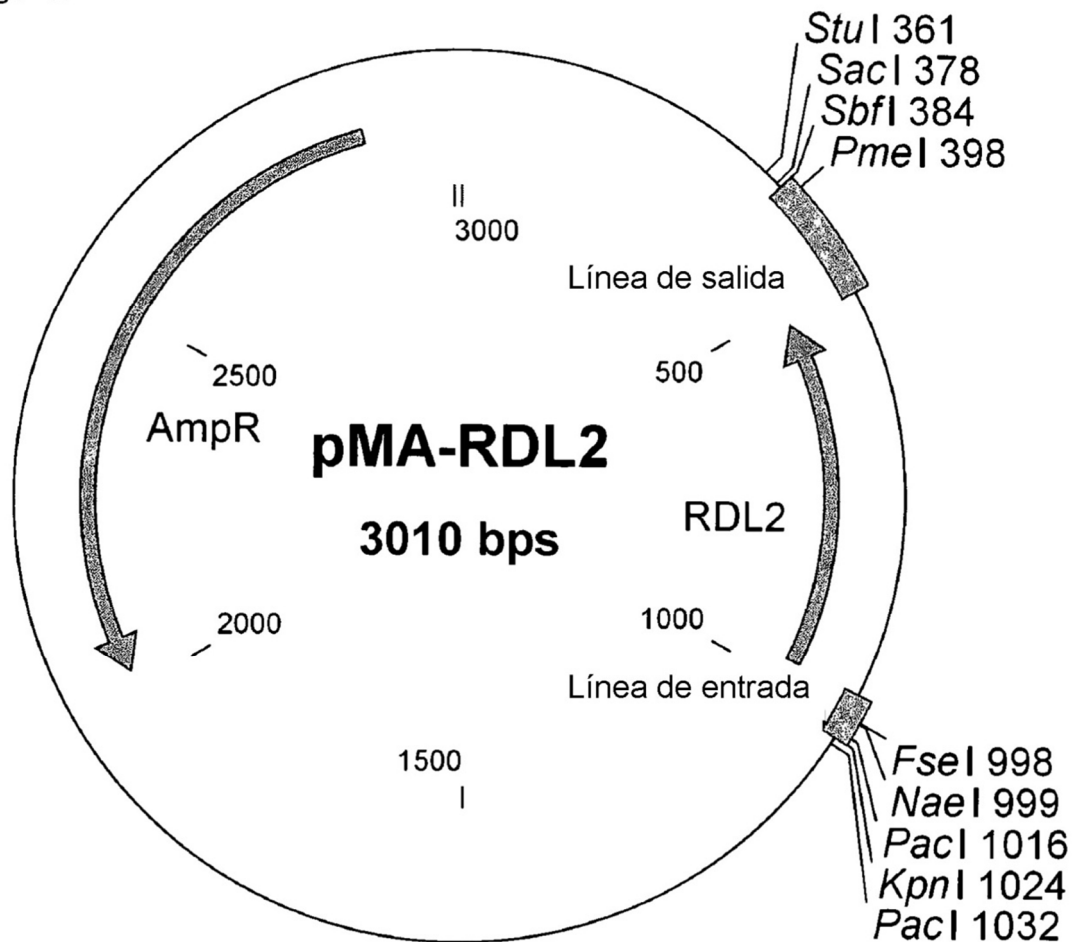
REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para la producción fermentativa de aminoácidos que contienen azufre seleccionados a partir del grupo L-metionina, L-cisteína, L-cistina, L-homocisteína y L-homocistina, que contiene los pasos:
 - a) puesta a disposición de un microorganismo de la familia Enterobacteriaceae o de un microorganismo de la familia Corynebacteriaceae, que codifica un gel para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa;
 - b) fermentación del microorganismo de a) en un medio que contiene como fuente de azufre inorgánica una sal de ácido tiosulfúrico o una mezcla de una sal de ácido tiosulfúrico y una sal de ácido sulfúrico, obteniéndose un caldo de fermentación, y
 - c) concentración del aminoácido que contiene ácido sulfúrico en el caldo de fermentación de b).
- 2.- El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el microorganismo sobreexpone uno o varios genes que codifican para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa; seleccionándose el polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa seleccionada a partir de los siguientes a) a d):
 - a) un polipéptido constituido por, o que contiene los polipéptidos Rdl2p, GlpE, PspE, YgaP, Thil, YbbB, SseA, YnjE, YceA, YibN, NCgl0671, NCgl1369, NCgl2616, NCgl0053, NCgl0054, NCgl2678, NCgl2890; tiosulfato-sulfurotransferasa de mamíferos, a modo de ejemplo la tiosulfato-transferasa de hígado vacuno (*Bos taurus*); preferentemente Rdl2p, GlpE, PspE, y de modo especialmente preferente Rdl2p;
 - b) un polipéptido constituido por, o que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;
 - c) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 70 % o más a la secuencia de aminoácidos de a) o b), presentando el polipéptido actividad de tiosulfato-sulfurotransferasa;
 - d) un polipéptido, que presenta una secuencia de aminoácidos que contiene una delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 45 restos aminoácido respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, presentando el polipéptido actividad de tiosulfato-sulfurotransferasa.
- 3.- El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la expresión del gen que codifica para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa se aumenta mediante una o varias medidas seleccionadas a partir del siguiente grupo:
 - a) la expresión del gen es controlada por un promotor, que conduce a una expresión intensificada frente a la cepa de partida en el microorganismo empleado para el procedimiento;
 - b) aumento del número de copias del gen que codifica para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa frente a la cepa de partida; preferentemente mediante inserción del gen en plásmidos o mediante integración del gen en el cromosoma del microorganismo en varias copias;
 - c) la expresión del gen se efectúa bajo empleo de un punto de enlace ribosómico, que conduce a una traducción intensificada frente a la cepa de partida en el microorganismo empleado para el procedimiento;
 - d) la expresión del gen se intensifica mediante una optimización del empleo de codón (codon usage) del gen, referido al microorganismo empleado para el procedimiento;
 - e) la expresión del gen se intensifica mediante la reducción de estructuras secundarias de mRNA en el mRNA transcrito por el gen;
 - f) la expresión del gen se intensifica mediante la eliminación de terminadores de ARN-polimerasa en el mRNA transcrito por el gen;
 - g) la expresión del gen se efectúa bajo empleo de secuencias estabilizadoras de mRNA en el mRNA transcrito por el gen.
- 4.- El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que, en el caso de la sal de ácido tiosulfúrico, se trata de una sal seleccionada a partir de sal alcalina, sal alcalinotérrica, sal amónica y mezclas de las mismas, preferentemente sal amónica.
- 5.- El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que, en el caso de la sal de ácido

sulfúrico se trata de una sal seleccionada a partir del grupo sal alcalina, sal alcalinotérrea, sal amónica y mezclas de las mismas, preferentemente sal amónica.

- 5 6.- El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la proporción de sal de ácido tiosulfúrico, referida al contenido total en azufre inorgánico en el medio y en el caldo de fermentación, se mantiene al menos en un 5 % en moles durante la fermentación.
- 7.- El procedimiento según alguna de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que, en el caso del aminoácido que contiene azufre, se trata de L-metionina.
- 8.- El procedimiento según alguna de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que, en el caso del microorganismo, se trata de la especie *Escherichia*, preferentemente el tipo *Escherichia coli*.
- 10 9.- El procedimiento según alguna de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que, en el caso del microorganismo, se trata de la especie *Corynebacterium*, preferentemente el tipo *Corynebacterium glutamicum*.
- 10.- El procedimiento según alguna de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el microorganismo se selecciona a partir de
 - 15 - *Corynebacterium glutamicum* con actividad y/o expresión de aspartato quinasa elevada y debilitamiento o delección de la proteína reguladora McbR en comparación con la cepa de partida;
 - *Escherichia coli*, con actividad y/o expresión de aspartato quinasa elevada y debilitamiento o delección de la proteína reguladora MetJ en comparación con la cepa de partida.
- 11.- Un microorganismo seleccionado a partir de
 - 20 - *Corynebacterium glutamicum* con actividad y/o expresión de aspartato quinasa elevada y debilitamiento o delección de la proteína reguladora McbR en comparación con la cepa de partida;
 - *Escherichia coli*, con actividad y/o expresión de aspartato quinasa elevada y debilitamiento o delección de la proteína reguladora MetJ en comparación con la cepa de partida;
- excretando o produciendo el microorganismo L-metionina, caracterizado por que el microorganismo sobreexpone un gen que codifica para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa.
- 25 12.- El microorganismo según la reivindicación 11, caracterizado por que este microorganismo sobreexpone un gen que codifica para un polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa, definiéndose el polipéptido con la actividad de una tiosulfato-sulfurotransferasa como en la reivindicación 2.
- 30 13.- El microorganismo según una de las reivindicaciones 11 a 12, caracterizado por que la cepa de partida se deriva de un microorganismo del grupo constituido por *Escherichia coli* MG1655, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* DH10B, *Escherichia coli* BW2952, *Escherichia coli* REL606, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium glutamicum* R, *Corynebacterium glutamicum* DSM20411 (denominación antigua *Brevibacterium flavum*), *Corynebacterium glutamicum* DSM20412 (denominación antigua *Brevibacterium lactofermentum*), *Corynebacterium glutamicum* DSM1412 (denominación antigua *Brevibacterium lactofermentum*), *Corynebacterium efficiens* YS-314^T (=DSM44549), *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608, *Corynebacterium glutamicum* DSM17322.
- 35

Fig. 1



AmpR: gen de resistencia a ampicilina; codifica para la beta-lactamasa

Línea de entrada: SEQ ID NO:6; contiene secuencias de identificación para los enzimas de restricción PacI y FseI, así como un punto de enlace ribosómico

RDL2: secuencia del gen RDL2 de *Saccharomyces cerevisiae* S288c

Línea de salida: SEQ ID NO:7; contiene un segundo codón de parada TAA, seguido del terminador T1 del gen *rnpB* de *E. Coli* MG1655. Después siguen secuencias de identificación para los enzimas de restricción PmeI y SbfI.