

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 659**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2009** **PCT/IB2009/056063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2011** **WO11080542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2009** **E 09807723 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017** **EP 2519643**

54 Título: **Aumento de la producción de metionina por sobreexpresión de succinato deshidrogenasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2018

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

72 Inventor/es:
FIGGE, RAINER

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 654 659 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aumento de la producción de metionina por sobreexpresión de succinato deshidrogenasa

CAMPO DEL INVENTO

5 El presente invento se refiere a un procedimiento para mejorar la producción de metionina por cultivación de un microorganismo modificado para aumentar la expresión de genes implicados en la síntesis de succinato deshidrogenasa. Los microorganismos eran modificados de manera tal que se aumentase el rendimiento de metionina/fuente de carbono. Se puede aislar metionina a partir del medio de fermentación.

TÉCNICA ANTERIOR

10 La succinato deshidrogenasa (= succinato oxidorreductasa, SQR) es un miembro funcional tanto del ciclo de Krebs como de la cadena respiratoria aerobia. La SQR cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el citoplasma bacteriano con una reducción concomitante de ubiquinona en la membrana. En *E. coli* y otras bacterias, la enzima se compone de cuatro subunidades. Las dos subunidades hidrófobas SdhC y SdhD anclan dos subunidades hidrófilas y catalíticas SdhA y SdhB a la superficie de la membrana interna. Cinco cofactores singulares están implicados en la oxidación de succinato a fumarato. En la SdhA está presente una molécula de flavina adenina dinucleótido (FAD) adjunta covalentemente para catalizar la oxidación de succinato por unos mecanismos de transferencia de hidruros. Luego se transfieren electrones individualmente a través de la unidad de transferencia de electrones (SdhB) que contiene unos racimos [2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S]. Un sitio de fijación de quinonas se forma por los residuos SdhC, SdhD y SdhB permitiendo la reducción de ubiquinona a ubiquinol. La enzima contiene también una molécula de heme *b* emparejada entre SdhC y SdhD que no es esencial para la función de la enzima (Yankovskaya y colaboradores 2003, Science 299, 700; Cheng y colaboradores 2008 Biochemistry 47, 6107).

15 El aminoácido L-metionina es un importante aditivo para piensos que se produce en grandes cantidades (600.000 t/an). La producción confía exclusivamente en una biosíntesis química y requiere precursores derivados de petróleo crudo. Al ejercerse una presión creciente sobre el precio de estos recursos no renovables, un procedimiento sostenible adquiere creciente interés. La producción por fermentación de metionina se ha convertido por lo tanto en una alternativa económicamente viable al procedimiento químico.

20 La producción de metionina por fermentación requiere una modificación de varias rutas que proporcionan precursores. Tres rutas principales contribuyen a la biosíntesis de metionina. El aspartato sirve como el precursor de la cadena principal de carbonos, la cisteína sirve como un donante de azufre y el metilen-THF sirve como donante del grupo metilo terminal. Por lo demás, la activación de la homoserina derivada de aspartato por la succinil-CoA es requerida para la primera etapa en la biosíntesis de metionina. La succinil-CoA es producida en el ciclo de Krebs y por lo tanto una expresión aumentada de las enzimas del ciclo de Krebs puede aumentar la producción de metionina. No obstante, se ha mostrado que una alta actividad en el ciclo de Krebs constituye una desventaja para la producción de aminoácidos, y el hecho de reducir la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs, tales como la isocitrato deshidrogenasa, puede ser beneficioso para la producción de aminoácidos (documentos de solicitudes de patentes internacionales WO2007017710 de Metabolic Explorer, WO2009133063 de Evonik Industries).

30 El documento WO 2009078973 (de Glycos Biotechnology) y el documento de patente europea EP1106684 (de Evonik Industries) divulgan que la delección (supresión) de genes de *sdh* aumenta la producción de aminoácidos y otros metabolitos que tienen interés industrial. Se entiende a partir de esta técnica de especialidad que el hecho de disminuir la expresión de genes *sdh* disminuirá la actividad en el ciclo de Krebs y por lo tanto la producción de CO₂, lo que a su vez debería tener un impacto positivo sobre el rendimiento de productos.

35 Hay una necesidad de aumentar el rendimiento de metionina que se produce a partir de una fuente de carbono renovable. Al contrario que la enseñanza de la técnica anterior, de que una actividad disminuida de la succinato deshidrogenasa aumenta el rendimiento de productos, se encontró que una expresión aumentada de la enzima succinato deshidrogenasa aumenta el rendimiento de metionina/glucosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL INVENTO

40 El invento es definido plenamente por las reivindicaciones anejas. Él se refiere a un método para aumentar la producción de metionina, en un proceso de fermentación que comprende las etapas de cultivar un microorganismo modificado para una producción mejorada de metionina en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y una fuente de azufre, y de recuperar metionina a partir del medio de cultivo, en donde el microorganismo es modificado ulteriormente por aumento de la expresión de gen(es) que codifica(n) una enzima succinato deshidrogenasa (*sdh*).

La expresión de este (estos) gen(es) es aumentada insertando en el microorganismo por lo menos una copia suplementaria de dicho(s) gen(es) que codifica(n) una succinato deshidrogenasa.

En una forma de realización del invento, la metionina es aislada ulteriormente a partir del medio de cultivo.

- 5 El invento se refiere también a un microorganismo, seleccionado entre enterobacteriáceas o bacterias corineformes para la producción de metionina por sobreexpresión de la succinato deshidrogenasa. Este microorganismo usado en el proceso del invento permite obtener un rendimiento aumentado de metionina/fuente de carbono.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

Microorganismo que produce metionina

- 10 El invento se refiere a un método para la producción de metionina en un proceso de fermentación, que comprende las siguientes etapas :

- cultivar un microorganismo modificado seleccionado entre el conjunto que se compone de enterobacteriáceas y bacterias corineformes con una expresión aumentada de genes implicados en la ruta de biosíntesis de metionina en comparación con el microorganismo no modificado, en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y una fuente de azufre, y

- 15 - recuperar metionina a partir del medio de cultivo,

en donde el microorganismo es modificado ulteriormente por aumento de la expresión de gen(es) que codifica(n) una enzima succinato deshidrogenasa, lo que se consigue insertando dentro del microorganismo por lo menos una copia suplementaria de los cuatro genes *sdhA*, *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* de *E. coli*.

- 20 Los términos "cultivo", "fermentación" o "proceso de fermentación" se usan de manera intercambiable para designar el crecimiento de bacterias sobre un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente simple de carbono. Esta fuente simple de carbono es metabolizada por el microorganismo para producir metionina.

- 25 Otro objeto del invento es un microorganismo modificado para usarse en dicho método para la producción de metionina en un proceso de fermentación, en donde el microorganismo es seleccionado entre el conjunto que consiste en: Enterobacteriáceas y bacterias corineformes, modificadas con una expresión aumentada de genes implicados en la ruta de biosíntesis de metionina en comparación con el microorganismo no modificado, en un medio de cultivo apropiado, en donde el microorganismo es modificado ulteriormente por aumento de la expresión de gen(es) que codifica(n) la enzima succinato deshidrogenasa, lo que se consigue por inserción dentro del microorganismo de por lo menos una copia suplementaria de los cuatro genes *sdhA*, *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* de *E. coli*.
30 Preferentemente la bacteria se selecciona entre el conjunto formado por *Escherichia coli* y *Corynebacterium glutamicum*.

Los microorganismos pueden comprender un(os) gen(es) endógeno(s) que codifican una enzima *sdh*.

- 35 El término "microorganismo modificado para una producción mejorada de metionina" designa a un microorganismo que ha sido modificado genéticamente con el fin de mejorar la producción de metionina por metabolización de una fuente simple de carbono en comparación con el microorganismo no modificado. Dichas modificaciones corresponden a una expresión aumentada de genes implicados en la ruta de biosíntesis de metionina. Una persona experta en la especialidad conoce cómo modular la expresión de genes específicos. Unas usuales modificaciones incluyen transformar microorganismos con elementos genéticos, incluyendo reemplazos de genes, modificación de promotores, e introducción de vectores para la expresión de genes heterólogos o endógenos.

- 40 El microorganismo modificado de acuerdo el invento se modifica mejorando la expresión de por lo menos un gen que codifica una de las subunidades de la enzima succinato deshidrogenasa. Esto se consigue insertando en el microorganismo por lo menos una copia suplementaria de los cuatro genes *sdhA*, *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* de *E. coli*.

- 45 Preferiblemente, todos los genes que codifican las diferentes subunidades de la enzima succinato deshidrogenasa son sobreexpresados. La succinato deshidrogenasa es generalmente un complejo de enzimas que contiene por lo menos tres subunidades. Cada subunidad es codificada por un gen. Por ejemplo, la especie *Corynebacterium* contiene tres genes *sdhA*, *sdhB* y *sdhC* que codifican la succinato deshidrogenasa (Bussmann y colaboradores, 2009, J. Biotechnol, 143(3), 173) mientras que otros microorganismos tales como *E. coli* o *S. cerevisiae* tienen cuatro genes para cuatro subunidades de succinato deshidrogenasa. Estos genes de *sdh* son organizados en un operón. El término operón describe una unidad de transcripción en donde varios genes son transcritos en un ARN mensajero policistrónico (números de acceso a *E. coli* para *sdhA*: P0AC41, para *sdhB*: P07014, para *sdhC* : P69054, para *sdhD*: P0AC44)..
- 50

Los términos "mejorar" o "mejorado" o "sobrexpresado" o "expresión aumentada", "expresión mejorada" o "sobrexpresión" se usan intercambiabilmente en el texto y tienen un significado similar. Estos términos, en este contexto, describen el aumento en la actividad intracelular de una actividad enzimática que es codificada por el correspondiente ADN, por ejemplo aumentando el número de copias del gen, usando un promotor más fuerte o usando un alelo con actividad aumentada, y posiblemente combinando estas medidas técnicas. Estos promotores pueden ser inducibles; ellos pueden ser homólogos o heterólogos. Una persona experta en la especialidad conoce cuáles promotores son los más convenientes, por ejemplo se usan ampliamente los promotores Ptrc, Ptac, Plac (Dickson y colaboradores, 1975, Science 187(4171), 27; de Boer y colaboradores, 1983, Proc Natl Acad Sci U S A, 80(1), 21; Brosius y colaboradores, 1985, J Biol Chem, 260(6), 3539) o el promotor lambda cl (Ptashne M, 1986, Blackwell Scientific, Cambridge, MA; Ptashne M, 2004, Cold Spring Harbor Lab Press; Little J, 2004, Richard Calendar.ed. Oxford University Press).

Cuando los genes son organizados en un operón, es posible aumentar su expresión añadiendo una copia suplementaria de estos genes que están bajo el control de un único promotor. La expresión puede ser también mejorada reemplazando el promotor de tipo salvaje cromosomal por un promotor artificial más fuerte que el promotor de tipo salvaje. Un experto en el sector conoce cómo determinar la fuerza de un promotor.

Para aumentar la expresión de un gen, éste puede ser codificado cromosomal o extracromosomalmente. Unas copias de estos genes pueden ser añadidas cromosomal o extracromosomalmente. Cromosomalmente, puede haber una o varias copias suplementarias en el genoma que pueden ser introducidas por métodos de recombinación conocidos por una persona experta en la especialidad. Extracromosomalmente, los genes pueden ser llevados por diferentes tipos de plásmidos o Cromosomas Artificiales Bacterianos que difieren con respecto a su origen de replicación y por lo tanto en su número de copias en la célula. Ellos pueden estar presentes en forma de 1-5 copias, aproximadamente 20 o hasta 500 copias, correspondiendo a plásmidos con bajo número de copias con replicación apretada (p.ej. pSC101, RK2), plásmidos con bajo número de copias (p.ej. pACYC, pRSF1010) o plásmidos con alto número de copias (p.ej. pSK bluescript II). En una forma de realización del invento, los genes *sdh* pueden ser sobreexpresados usando una expresión extracromosomal. En esta forma de realización del invento, los genes *sdh* son llevados por un Cromosoma Artificial Bacteriano.

La expresión de las enzimas puede ser estimulada o reducida por unos elementos que estabilizan o desestabilizan al correspondiente ARN mensajero (Carrier y Keasling, 1998, Biotechnol. Prog. 15, 58) o a las proteínas (p.ej. marcas GST, Amersham Biosciences).

Los microorganismos, de acuerdo con el presente invento, contienen uno o varios alelos de los genes que han de ser mejorados de acuerdo con el invento. El microorganismo, de acuerdo con el invento, está llevando por lo menos una copia suplementaria de genes que codifican la enzima succinato deshidrogenasa de *E. coli*, *sdhA*, *sdhB*, *sdhC* y *sdhD*. En una forma de realización preferida del invento, estos genes son clonados en el Cromosoma Artificial Bacteriano pCC1BAC.

Los genes en dicha copia suplementaria pueden ser organizados en un operón.

Unos/as correspondientes genes y proteínas se pueden identificar en otros organismos, más particularmente microorganismos.

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

Unos COGs (del inglés clusters of orthologous groups of proteins = racimos de grupos ortólogos de proteínas; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen comparando secuencias de proteínas procedentes de 66 genomas plenamente secuenciados que representan a 30 linajes filogénicos mayoritarios. Cada COG es definido a partir de por lo menos tres linajes, lo que permite la identificación de anteriores dominios conservados.

Los medios de identificar secuencias homólogas y sus homologías porcentuales son bien conocidos por los expertos en la especialidad e incluyen en particular los programas BLAST, que se pueden usar a partir del sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros de defecto indicados en ese sitio web. Las secuencias obtenidas pueden ser luego aprovechadas (p.ej. alineadas) usando, por ejemplo, los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) or MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), con los parámetros de defectos indicados en estos sitios web.

Usando las referencias dadas en el GenBank para genes conocidos, unos expertos en la especialidad son capaces de determinar los genes equivalentes en otros/as organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo rutinario se lleva a cabo ventajosamente usando unas secuencias de consenso que

pueden ser determinadas llevando a cabo alineaciones de secuencias con genes derivados de otros microorganismos, y diseñando sondas degeneradas para clonar al correspondiente gen en otro organismo. Estos métodos rutinarios de biología molecular son bien conocidos por los expertos en la especialidad, y se reivindican, por ejemplo en (1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2ª ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

El microorganismo modificado de acuerdo con el invento puede comprender además otras modificaciones para aumentar la producción de metionina. Preferiblemente, el microorganismo del invento comprende, además de una expresión aumentada de genes que codifican una enzima *sdh*, unas modificaciones adicionales para mejorar la producción de metionina. Unas modificaciones para aumentar la producción de metionina son bien conocidas en la especialidad. Estas modificaciones se describen por ejemplo en los documentos WO2009/043803, WO2007/077041, WO2005/111202. Para mejorar la producción de metionina, el microorganismo puede exhibir una expresión aumentada de por lo menos un gen seleccionado entre el conjunto que se compone de:

- *cysP* que codifica una proteína que fija sulfato periplasmático, como se describe en el documento WO2009/043803 y en,
- *cysU* que codifica un componente de la transportadora de sulfato del tipo ABC, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *cysW* que codifica una proteína de transporte de sulfato fijado a una membrana como se describe en el documento WO2009/043803,
- *cysA* que codifica una sulfato permeasa, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *cysM* que codifica una O-acetil serina sulfhidralasa, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *cysI* y *cysJ* codifican respectivamente las subunidades alfa y beta de una sulfito reductasa como se describen en el documento WO2009/043803. Preferiblemente *cysI* y *cysJ* son sobreexpresados conjuntamente,
- *cysI* que codifica una sulfito reductasa, subunidad alfa, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *cysH* que codifica una adenilil sulfato reductasa, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *cysE* que codifica una serina aciltransferasa, como se describe en el documento WO2007/077041,
- *gcvT* que codifica una aminometil transferasa dependiente de tetrahidrofolato, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *gcvH* que está implicado en la escisión de glicina por codificación de una portadora del grupo aminoetil, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *gcvP* que codifica una glicina deshidrogenasa, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *lpd* que codifica una lipoamida deshidrogenasa, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *serA* que codifica una fosfoglicerato deshidrogenasa, como se describe en la solicitud de patente WO2009/043803,
- *serB* que codifica una fosfoserina fosfatasa, como se describe en la solicitud de patente WO2009/043803,
- *serC* que codifica una fosfoserina aminotransferasa, como se describe en la solicitud de patente WO2009/043803,
- *glyA* que codifica una serina hidroximetiltransferasa, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *metF* que codifica una 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa, como se describe en el documento WO2007/077041,
- alelos de *metA* que codifican unas homoserina succiniltransferasas con reducida sensibilidad a la retroalimentación a S-adenosilmetionina and/or metionina como se describen en el documento WO2005/111202,
- alelos de *thrA* or *thrA* que codifican aspartocinasas/homoserina deshidrogenasa con reducida inhibición de la retroalimentación a treonina, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *metH* que codifica una homocisteina-N5-metiltetrahidrofolato transmetilasa dependiente de B12, como se describe en el documento WO2007/077041.

Opcionalmente, el microorganismo puede exhibir una inhibición de la expresión de por lo menos uno de los siguientes genes:

- *pykA* que codifica una piruvato cinasa, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *pykF* que codifica una piruvato cinasa, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *purU* que codifica una formiltetrahidrofolato desformilasa, como se describe en el documento WO2009/043803,
- *metJ* que codifica el represor de metionina como se describe en el documento de patente japonesa JP 2000/157267.

Opcionalmente, se pueden usar los siguientes genes modificados que codifican enzimas con modificadas propiedades de inhibición de la retroalimentación:

- enzimas que codifican mutantes de *metA* con reducida sensibilidad de retroalimentación a metionina y S-adenosilmetionina como se describen en el documento WO2005108561
- mutantes de *thrA* con reducida sensibilidad de retroalimentación a treonina como se describen en el documento WO2005108561.

Los microorganismos pueden ser modificados ulteriormente para aumentar la producción de metionina por uso de un alelo *metB* alterado que usa preferente o exclusivamente H₂S para la producción de homocisteína a partir de O-succinil-homoserina tal como se describe en la solicitud de patente WO2004/076659.

Los términos expresión atenuada, expresión reprimida o atenuación, inhibición, se usan intercambiabilmente en el texto y tienen un significado similar. En este contexto, el término designa la supresión parcial o completa de la expresión de un gen, del que luego se afirma que está "atenuado". Esta supresión de la expresión puede ser o bien una inhibición de la expresión del gen, una delección de la totalidad o parte de la región promotora necesaria para la expresión del gen, una delección en la región codificadora del gen, o el intercambio del promotor de tipo salvaje por un promotor natural o sintético más débil. Preferentemente, la atenuación de un gen es esencialmente supresión o delección completa de ese gen, que puede ser reemplazado por un gen marcador de selección que facilita la identificación, el aislamiento o la purificación de las cepas.

De acuerdo con una opción específica, el microorganismo modificado sobreexpresa por lo menos a un gen seleccionado en el conjunto que consiste en *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *cysE*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *glyA*, *metF*, *metA* (con una sensibilidad reducida a la retroalimentación), *thrA* y *metH*.

Opcionalmente, el microorganismo modificado tiene una expresión atenuada de por lo menos un gen seleccionado entre el conjunto que se compone de *pykA*, *pykF*, *metJ* y *purU*.

Opcionalmente, el microorganismo modificado sobreexpresa por lo menos a un gen seleccionado entre el conjunto que consiste en *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *cysE*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *glyA*, *metF*, *metA* (con una sensibilidad reducida a la retroalimentación), *thrA* y *metH* y reprime por lo menos a un gen seleccionado entre el conjunto que se compone de *pykA*, *pykF*, *metJ* y *purU*.

Preferiblemente, el microorganismo sobreexpresa a los genes *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *cysE*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *glyA*, *metF*, *metA* (con una sensibilidad reducida a la retroalimentación), *thrA* (preferentemente con una sensibilidad reducida a la retroalimentación) y *metH*. *serA*, *serB*, *serC*, *glyA* y reprime a los genes *pykA*, *pykF*, *metJ* y *purU*.

Otros genes pueden requerir modificaciones para optimizar la producción de metionina. Estos genes han sido identificados particularmente en los documentos WO2007/077041 y WO2007/020295.

Medio de cultivo

En el método del invento el microorganismo modificado es cultivado en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y una fuente de azufre. Un "medio de cultivo apropiado" es un medio apropiado para el cultivo y el crecimiento del microorganismo. Tales medios son bien conocidos por una persona experta en la especialidad en fermentación de microorganismos, dependiendo del microorganismo que se cultive.

El término "fuente de carbono" de acuerdo con el presente invento designa a cualquier fuente de carbono que se puede usar por los expertos en la especialidad para soportar el crecimiento normal de un microorganismo, que puede ser hexosas (tales como glucosa, galactosa o lactosa), pentosas, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos (tales como sacarosa, celobiosa o maltosa), melazas, almidón o sus derivados, hemicelulosas, glicerol y sus

combinaciones. Una fuente simple de carbono especialmente preferida es glucosa. Otra fuente simple de carbono preferida es sacarosa.

La fuente de azufre para la producción por fermentación de L-metionina puede ser cualquiera de las siguientes: sulfato, tiosulfato, hidrogeno sulfuro, ditionato, ditionito, sulfito, metilmercaptano, dimetildisulfuro o una de sus combinaciones.

En una forma de realización preferida del invento, la fuente de azufre es un sulfato y/o tiosulfato.

La fuente de nitrógeno puede ser una sal de amonio o amoníaco gaseoso.

Producción mejorada de metionina

En el invento, el rendimiento de metionina/fuente de carbono es aumentado mejorando la expresión de los genes que codifican una succinato deshidrogenasa. El término "rendimiento de metionina/fuente de carbono" define la cantidad de metionina obtenida durante la fermentación dividida por la cantidad de la fuente de carbono que se ha consumido. Él puede ser expresado en tanto por ciento de g de metionina/g de fuente de carbono o en moles de metionina/moles de fuente de carbono. El término "mejorado" en este contexto describe un aumento medible comparado con el microorganismo sin las modificaciones especificadas y/o con el medio de cultivo sin las modificaciones. En formas de realización preferidas, el aumento es por lo menos de 1 % de g/g, preferiblemente por lo menos de 2 % g/g, más preferiblemente de 4 %.

Para medir este aumento han de medirse la cantidad de glucosa consumida y la cantidad de metionina producida. La cantidad de la fuente de carbono que ha sido consumida se calcula determinando la concentración de glucosa en el medio de crecimiento por una HPLC refractométrica o de acuerdo con el método de Brix para soluciones de lotes alimentados (fed-batch). Para cultivos en lotes la glucosa consumida corresponde a la cantidad de glucosa residual al comienzo del experimento de la cual se resta la cantidad de la glucosa residual al final del experimento. Para la fermentación por lotes alimentados la cantidad de glucosa consumida corresponde a la suma de la glucosa en el cultivo por lotes más la glucosa añadida en el inóculo y la cantidad de glucosa inyectada durante la fase de lotes alimentados de la cual se resta la cantidad de glucosa residual al final del experimento.

El término "metionina obtenida" incluye L-metionina y el derivado de metionina NAM fácilmente recuperable. La cantidad de metionina obtenida en el medio se mide por una HPLC después de una derivatización con OPA/Fmoc usando L-metionina (Fluka, Ref 64319) como patrón. La cantidad de NAM se determina usando una HPLC refractométrica usando NAM (Sigma, Ref 01310) como patrón.

Recuperación de metionina

Después de la fermentación de L-metionina, sus precursores o compuestos derivados de ellos, tales como N-acetil-metionina se recuperan y eventualmente se purifican. Los métodos para recuperar y purificar los compuestos producidos son bien conocidos por una persona experta (documentos WO 2005/007862, WO 2005/059155).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: MG1655 metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU (pME101-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11) (pCC1BAC-sdhCDAB-TT02-serB-glyA-serA-serC) y MG1655 metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF DmetJ DpykF DpykA DpurU (pME101-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11) (pCC1BAC-serB-glyA-serA-serC)

Unas cepas productoras de metionina han sido descritas en las solicitudes de patente WO2009043803 y WO2007/077041.

I. Construcción del vector pCC1BAC-sdhCDAB-TT02-serB-glyA-serA-serC

Para aumentar el nivel de succinato deshidrogenasa, SdhCDAB, en la cepa productora de metionina, los cuatro genes *sdhCDAB* cuando fueron clonados con su propio promotor en el vector de control de copias pCC1BAC-serB-glyA-serA-serC (con el vector pCC1BAC de Epicentre) previamente descrito en la solicitud de patente WO2009043803).

Con esta finalidad, la región de *sdhCDAB-TT02* se amplificó a partir del genoma de MG1655 de *E. coli* usando los oligonucleótidos *sdhCDAB-F* y *sdhCDAB-TT02-R* (secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>), con TT02 que es el terminador de transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* (Orosz y colaboradores, 1991, Eur. J. Biochem. 201, 653). El resultante producto de PCR se clonó en el vector pSCB (de Stratagene), se verificó por secuenciación y el vector se denominó pSCB-*sdhCDAB-TT02*.

sdhCDAB-F

atgcgtGCATGCatctGGCGCCGAATTGGTCAATACTTCCACACTGTTAC
con

- una región (letra minúscula) con bases suplementarias,
- una región (letra mayúscula subrayada) que alberga los sitios *SphI* y *SfoI*,

5 • una región (letra mayúscula negrita) homóloga con la región *sdhCDAB* (desde 753931 hasta 753958)

sdhCDAB-TT02-R

aagcgctGCATGCAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCTGACTGAGCCTTTCTGTTT

TATTTGATGTTTACGCATTACGTTGCAACAACATCG

con

- una región (letra minúscula) con bases suplementarias,
- una región (letra mayúscula subrayada) que alberga los sitios *SphI*,
- una región (letra mayúscula cursiva) para la secuencia TT02 que corresponde hasta la secuencia terminadora de transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli*,
- una región (letra mayúscula negrita) homóloga con la *sdhCDAB* región (desde 757603 hasta 757629).

10 Para transferir los genes *sdhCDAB*-TT02 al vector pCC1BAC, el vector pSCB-*sdhCDAB*-TT02 se restringió con la enzima *SphI* y la región *sdhCDAB*-TT02 se clonó dentro del vector pCC1BAC-serB-glyA-serA-serC restringido por la misma enzima. El resultante vector se denominó pCC1BAC- *sdhCDAB*-TT02-serB-glyA-serA-serC.

2. Construcción de la cepa MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}F-cysPUWAM* *P_{trc}F-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP* *P_{trc}36-ARNmst17-metF* Δ *metJ* Δ *pykF* *DpykA* Δ *purU* (pME101-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11) (pCC1BAC-*sdhCDAB*-TT02-serB-glyA-serA-serC)

20 Subsiguientemente, los plásmidos pME101-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 (previamente descritos en la solicitud de patente WO2007/077041) y pCC1BAC-*sdhCDAB*-TT02-serB-glyA-serA-serC se introdujeron por electroporación dentro de la cepa MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}F-cysPUWAM* *P_{trc}F-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP* *P_{trc}36-ARNmst17-metF* Δ *metJ* Δ *pykF* *DpykA* Δ *purU* dando la cepa MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}F-cysPUWAM* *P_{trc}F-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP* *P_{trc}36-ARNmst17-metF* Δ *metJ* Δ *pykF* *DpykA* Δ *purU* (pME101-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11) (pCC1BAC-*sdhCDAB*-TT02-serB-glyA-serA-serC).

3. Construcción de la cepa MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}F-cysPUWAM* *P_{trc}F-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP* *P_{trc}36-ARNmst17-metF* Δ *metJ* Δ *pykF* *DpykA* Δ *purU* (pME101-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11) (pCC1BAC-serB-glyA-serA-serC)

30 Los plásmidos pME101-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 (previamente descrito en la solicitud de patentes WO2007/077041) y pCC1BAC-serB-glyA-serA-serC (previamente descrito en la solicitud de patente WO2009043803) se introdujeron por electroporación dentro de la cepa MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}F-cysPUWAM* *P_{trc}F-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP* *P_{trc}36-ARNmst17-metF* Δ *metJ* Δ *pykF* *DpykA* Δ *purU* dando la cepa MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}F-cysPUWAM* *P_{trc}F-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP* *P_{trc}36-ARNmst17-metF* Δ *metJ* Δ *pykF* *DpykA* Δ *purU* (pME101-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11) (pCC1BAC-serB-glyA-serA-serC).

35 Ejemplo 2. Evaluación de las cepas

Cepa 1: MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}F-cysPUWAM* *P_{trc}F-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP* *P_{trc}36-ARNmst17-metF* Δ *metJ* Δ *pykF* *DpykA* Δ *purU* (pME101-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11) (pCC1BAC-*sdhCDAB*-TT02-serB-TT07-glyA-serA-serC).

40 Cepa 2: MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}F-cysPUWAM* *P_{trc}F-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP* *P_{trc}36-ARNmst17-metF* Δ *metJ* Δ *pykF* *DpykA* Δ *purU* (pME101-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11) (pCC1BAC-serB-glyA-serA-serC).

Las cepas productoras se evaluaron en pequeños matraces Erlenmeyer. Un precultivo de 5,5 ml se hizo crecer a 37°C durante 16 horas en un medio mixto (10 % de un medio LB (Sigma 25 %) con 2,5 g.l⁻¹ de glucosa y 90 % de medio mínimo PC1). Éste se usó para inocular un cultivo de 50 mL hasta llegar a una DO₆₀₀ of 0,2 en un medio PC1. Si fuese necesario se añadieron espectinomicina y kanamicina hasta llegar a una concentración final de 50 mg.l⁻¹ y cloramfenicol hasta llegar a 30 mg.l⁻¹. La temperatura de los cultivos era de 37°C. Cuando el cultivo hubo alcanzado una DO₆₀₀ de 5 hasta 7, los aminoácidos extracelulares se cuantificaron por HPLC después de una derivatización con OPA/Fmoc y otros metabolitos relevantes se analizaron usando una HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa) y una GC-MS después de sililación. Para cada cepa, se hicieron tres repeticiones.

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

Tabla 1: Rendimiento de metionina (Y_{met}) en % g de metionina/g de glucosa producida en un cultivo discontinuo por las diferentes cepas. Para la definición exacta del rendimiento de metionina/glucosa véase más adelante. SD designa a la desviación típica para los rendimientos, que se calculó sobre la base de tres repeticiones.

Cepa	Y_{met}	SD
Cepa 1: (pCC1BAC-sdhCDAB-TT02-serB-TT07-glyA-serA-serC)	12.85	0,24
Cepa 2: (pCC1BAC-serB-TT07-glyA-serA-serC)	11.51	0,25

- 5 La concentración extracelular de metionina se cuantificó por una HPLC después de una derivatización con OPA/FMOC. La concentración residual de glucosa se analizó usando una HPLC con detección refractométrica. El rendimiento de metionina se expresó de la siguiente manera:

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

10

Como puede observarse en la Tabla 1 el rendimiento de metionina/glucosa (Y_{met}) aumenta al efectuar una sobreexpresión de *sdhCDAB*.

REFERENCIAS:

1. Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S, 2003, Science, 299, 700-704
2. Cheng VW, Johnson A, Rothery RA, Weiner JH, 2008, Biochemistry, 47, 9107-9116
- 5 3. Bussmann M, Emer D, Hasenbein S, Degraf S, Eikmanns BJ, Bott M, 2009, J. Biotechnol, 143(3), 173-182
4. Dickson RC, Abelson J, Barnes WM, Reznikoff WS, 1975, 187(4171), 27-35
5. Brosius J, Erfle M, Storella J, J Biol Chem, 260(6), 3539-41
6. Ptashne M, 1986; A genetic switch.. Blackwell Scientific, Cambridge, MA.
- 10 7. Ptashne M, 2004; A genetic switch: Phage lambda revisited. Cold Spring Harbor Lab Press. Cold Spring Harbor, NY
8. Little J, 2004; The bacteriophages, Part II: Life of phages, 8. Gene regulatory circuitry of phage λ . 2ª edición 2004. Richard Calendar.ed. Oxford University Press
9. Carrier y Keasling, 1998, Biotechnol. Prog, 15, 58-64
10. Orosz A., Boras I., Venetianer P, 1991, European Journal of Biochemistry, 201, 653-659

LISTA DE SECUENCIAS

	<110>	EXPLORADOR METABÓLICO FIGGE, Rainer	
5	<120>	AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE METIONINA POR SOBREENPRESIÓN DE SUCCINATO DESHIDROGENASA	
	<130>	D28308	
	<160>	2	
	<170>	PatentIn version 3.3	
10	<210>	1	
	< 211>	50	
	< 212>	ADN	
	< 213>	artificial	
	<220>		
	< 223>	Oligonucleótido sdhCDAB-F	
15	<400>	1	
		atgctgcat gcatctggcg ccgaattggt caatactcc acactgttac	50
	<210>	2	
	< 211>	95	
	< 212>	ADN	
20	< 213>	artificial	
	<220>		
	< 223>	Oligonucleótido sdhCDAB-TT02-R	
	<400>	2	
		aagcgtgca tgcaacagat aaaacgaaag gccagtcctt togactgagc ctttcgtttt	60
		atttgatggt tacgcattac gttgcaacaa catcg	95
25			

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de metionina en un proceso de fermentación, que comprende las siguientes etapas:
 - cultivar un microorganismo modificado seleccionado entre *Enterobacteriaceas* y bacterias *Coryneformes* con una expresión mejorada de genes implicados en la ruta de biosíntesis de metionina en comparación con el microorganismo no modificado en un medio de cultivo apropiado, que comprende una fuente de carbono y una fuente de azufre, y
 - recuperar metionina a partir del medio de cultivo,
- 5 en donde el microorganismo es modificado ulteriormente mejorando la expresión de gen(es) que codifican una enzima succinato deshidrogenasa, lo que se consigue insertando en el microorganismo por lo menos una copia suplementaria de los cuatro genes *sdhA*, *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* de *E. coli*.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la fuente de azufre en el medio de cultivo es sulfato, tiosulfato, hidrógeno sulfuro, ditionato, ditionito, sulfito o una combinación de las diferentes fuentes.
3. El método de la reivindicación 1 a 2, en donde la fuente de carbono es glucosa o sacarosa.
- 15 4. El método de la reivindicación 1 a 3 que comprende una etapa de aislamiento de metionina a partir del medio de cultivo.
5. Un microorganismo seleccionado entre *Enterobacteriaceas* y bacterias *Coryneformes* modificado con una expresión aumentada de gen(es) implicados en la ruta de biosíntesis de metionina en comparación con el microorganismo no modificado.
- 20 en un medio de cultivo apropiado, en donde el microorganismo es modificado ulteriormente por mejora de la expresión de un(os) gen(es) que codifica(n) la enzima succinato deshidrogenasa lo que se consigue insertando dentro del microorganismo por lo menos una copia suplementaria de los cuatro genes *sdhA*, *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* de *E. coli*.
6. El microorganismo de la reivindicación 5, que comprende una copia adicional del operón *sdh* procedente de *E. coli*.
- 25 7. El microorganismo de la reivindicación 5 a 6, en donde éste se selecciona entre el conjunto que se compone de *E. coli* y *C. glutamicum*.