

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 789**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2014 PCT/EP2014/068539**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15028674**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2014 E 14757955 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3039153**

54 Título: **Microorganismo para la producción de metionina con mejor actividad de metionina sintasa y flujo de metionina**

30 Prioridad:

30.08.2013 EP 13306185

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

13.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DISCHERT, WANDA;
VASSEUR, PERRINE y
FIGGE, RAINER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 693 789 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismo para la producción de metionina con mejor actividad de metionina sintasa y flujo de metionina.

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante, es decir, *Escherichia coli*, útil para la producción de L-metionina y/o sus derivados, y a procedimientos para la preparación de L-metionina. El microorganismo de la invención se modifica de forma tal que la producción de L-metionina se mejora potenciando su actividad de metionina sintasa dependiente de cobalamina, así como también su exportación de L-metionina. En particular, los genes *metH*, *fldA*, *fpr* o sus genes homólogos y los genes *ygaZ* y *ygaH* o sus genes homólogos se hiperexpresan en el microorganismo.

Técnica anterior

Los compuestos que contienen azufre tales como cisteína, homocisteína, metionina o S-adenosilmetionina son críticos para el metabolismo celular. En particular la L-metionina, un aminoácido esencial que no puede ser sintetizado por los animales, cumple una función importante en muchas funciones corporales. La mayor parte de la metionina producida industrialmente se utiliza ampliamente como pienso animal y aditivo de alimentos.

Con la disminución del uso de proteínas animales como consecuencia de BSE y gripe aviar, la demanda de metionina pura ha aumentado. Comúnmente, la D,L-metionina se produce químicamente a partir de acroleína, metil mercaptano y cianuro de hidrógeno. No obstante, la mezcla racémica no actúa tan bien como la L-metionina pura (Saunderson, 1985). A su vez, si bien la L-metionina pura puede producirse a partir de metionina racémica, por ejemplo, a través del tratamiento con acilasa de N-acetil-D,L-metionina, esto aumenta drásticamente los costes de producción. Por consiguiente, la creciente demanda de L-metionina pura sumada a las preocupaciones ambientales hace que la producción microbiana de metionina sea una perspectiva atractiva. Otros aminoácidos importantes, como lisina, treonina y triptófano, se producen mediante fermentación para uso en pienso animal. En consecuencia, estos aminoácidos se pueden elaborar usando glucosa y otros recursos renovables como materiales de partida. La producción de L-metionina mediante fermentación aún no ha sido exitosa, pero se está desarrollando tecnología para esto. Se han descrito previamente distintos planteamientos para la optimización de L-metionina en microorganismos (véanse, por ejemplo, las patentes o solicitudes de patentes US7.790.424, US7.611.873, WO2002/10209, WO2005/059093 y WO2006/008097); no obstante, la producción industrial de L-metionina proveniente de microorganismos requiere mayores avances.

En *Escherichia coli*, dos enzimas distintas catalizan la etapa terminal en la síntesis *de novo* de metionina; la metionina sintasa dependiente de cobalamina (MetH, EC 2.1.1.13), que contiene un grupo prostético necesario para la actividad, y la metionina sintasa independiente de cobalamina (MetE, EC 2.1.1.14) (Foster *et al.*, 1961; Gonzalez *et al.*, 1992). La metionina sintasa dependiente de cobalamina, MetH, es una proteína de ~136 kDa que contiene cuatro dominios: un dominio que contiene el cofactor de cobalamina (dominio Cob), un dominio que se une al sustrato metil-THF (dominio CH3-THF), un dominio que se une al sustrato homocisteína (dominio Hcy), y un dominio que se une a S-Adenosil-Metionina (SAM) (dominio Adomet) (Matthews, 2001). En presencia de oxígeno, la enzima es inactivada por oxidación (Banerjee *et al.*, 1990). Con el fin de reactivar la enzima, se produce una metilación reductora. La reacción implica un grupo metilo provisto por SAM que se une al dominio AdoMet de la enzima, y dos electrones transferidos mediante una cadena de transporte externa. Los dos electrones son provistos por NADPH y transferidos mediante una cadena de reducción y oxidación impulsada por un potencial cuesta abajo compuesta por una flavodoxina reductasa que contiene FAD, FldA y FMN, Fpr (Fujii & Huennekens, 1974; Wan & Jarrett, 2002) en *Escherichia coli*. Como se describe en la solicitud de patente WO2009/144270, en *Corynebacterium glutamicum* se han identificado los homólogos funcionales de FldA y Fpr. Son respectivamente FdxC, FdxD o FdxA y FprA1, FprA2, FprA3 o FldR1.

El complejo de proteínas YgaZ y YgaH es miembro de la familia de exportadores de aminoácidos de cadena ramificada (LIV-E) responsable de exportar L-valina. Del mismo modo, YgaZH está también implicado en la exportación de metionina, como lo demostraron Trötschel y colaboradores para BrnFE, el homólogo de YgaZH de *Corynebacterium glutamicum* (Trötschel *et al.*, 2005).

Se han presentado numerosas solicitudes de patentes sobre mejoras en la actividad de metionina sintasa por diferentes métodos con el fin de producir L-metionina:

– Los documentos WO2007/012078 y WO2007/135188 de BASF reivindican, entre otras modificaciones, la alteración genética que produce la hiperexpresión de por lo menos *metH* y/o *metE*,

– El documento WO2009/144270 de Evonik describe un método para producir metionina con un microorganismo que exhibe una mayor cantidad y/o actividad de un sistema de reactivación de MetH dependiente de cob(l)alamina,

– El documento WO2008/080900 de Evonik reivindica una forma de MetH^{FBR} (resistente a retroalimentación) que debería ser más resistente a altas concentraciones de L-metionina.

Del mismo modo, algunas patentes describen la hiperexpresión de genes que codifican el sistema de excreción de metionina en diferentes microorganismos:

– La reducción de la absorción de L-metionina en *Corynebacterium* se describe en las solicitudes de patentes WO2002/097096 y WO2005/085463 (Degussa) o,

5 – La hiperexpresión de un exportador de aminoácidos de cadena ramificada (YgaZH) responsable de la exportación de L-valina y L-metionina se describe en las solicitudes de patentes EP1239041 (Ajinomoto) y WO2008/08221 I (CJ Corporation).

Los inventores han descubierto sorprendente e inesperadamente que el incremento de flujo de L-metionina con la mejora de la actividad de L-metionina sintasa dependiente de cobalamina en un microorganismo que produce en exceso L-metionina recombinante mejoran la producción de metionina.

Compendio de la invención

La invención se refiere a un microorganismo recombinante, es decir *Escherichia coli*, y a un método para optimizar la producción de metionina y/o sus derivados, en donde se potencian la actividad de metionina sintasa dependiente de cobalamina y el flujo de metionina mediante la hiperexpresión de *metH* y de los genes *fldA* y *fpr* de *E. coli* mientras que el flujo de metionina se potencia hiperexpresando los genes *ygaZH* de *E. coli* o sus genes homólogos.

El microorganismo recombinante, es decir *Escherichia coli*, puede además comprender otras modificaciones genéticas como:

– un aumento de la expresión de por lo menos uno de los siguientes genes: *ptsG*, *pyc*, *pntAB*, *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysl*, *cysH*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *metF*, *metA*, alelo *metA** que codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina, *thrA* o un alelo *thrA** que codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina y/o

– una expresión atenuada de uno de los siguientes genes: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *ybdL*, *udhA*, *dgsA*, *metE*, *metN*, *metI*, *metQ* o *yncA*.

En una realización particular, la presente invención se refiere a una *Escherichia coli* recombinante en donde: a) los genes *metH*, y opcionalmente los genes *fldA* y *fpr* de *E. coli* se hiperexpresan, b) los genes *ygaZ* y *ygaH* de *E. coli* o sus genes homólogos que se originan de *Citrobacter koseri*, *Shigella .flexneri*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Photorhabdus luminescens*, *Citrobacter youngae* o *Citrobacter .freundii* se hiperexpresan, y c) la expresión de los genes *metA**, *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP*, *metF*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *thrA**, *ptsG* y *pyc* se potencia; y d) la expresión de los genes *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *yncA*, *dgsA* y *metE* se atenúa.

Descripción detallada de la invención

Antes de describir en detalle la presente invención, se ha de entender que la presente invención no se limita a métodos ejemplificados particularmente y que puede variar. Se ha de entender también que la terminología empleada en la presente invención tiene fines descriptivos de las realizaciones particulares de la invención y no está destinada a ser limitativa, solo estará limitada por las reivindicaciones anejas.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en este documento, ya sea en lo precedente o en lo sucesivo, se incorporan a la presente memoria por referencia en su totalidad.

Asimismo, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas microbiológicas y moleculares convencionales dentro de la experiencia en la técnica. El experto en la materia conoce dichas técnicas, las cuales se explican exhaustivamente en la bibliografía.

Se ha de destacar que tal como se emplean en la presente memoria y en las reivindicaciones anejas, las formas en singular "un/a", "un/uno", y "el/la" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto indique claramente algo distinto. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a "un microorganismo" incluye una pluralidad de dichos microorganismos, y una referencia a un "gen endógeno" es una referencia a uno o más genes endógenos, etc. A menos que se defina algo distinto, todos los términos técnico-científicos utilizados en este documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente el experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Si bien se puede usar cualquier material y método similar o equivalente a aquellos descritos en este documento para practicar o ensayar la presente invención, se describen ahora los materiales y métodos preferidos.

En las reivindicaciones que siguen y en la descripción consecutiva de la invención, excepto si el contexto requiere algo distinto debido a lenguaje expreso o implicancia necesaria, los términos "comprender", "contener", "implicar" o "incluir" o variaciones tales como "que comprende", "que contiene", "que implica", "que incluye" se utilizan en sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características mencionadas pero no para excluir la presencia o adición de otras características en las distintas realizaciones de la invención.

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

5 "Derivados de metionina " hace referencia a moléculas análogas de metionina que presentan la misma estructura química, pero difieren de la metionina con por lo menos un grupo químico. En la presente invención, los derivados de metionina preferidos son N-acetil metionina (NAM), S-adenosil metionina (SAM) e hidroximetionina (o análogos de metionina hidroxilada o MHA).

El término "microorganismo", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una bacteria, es decir, *Escherichia coli*, que no se modifica artificialmente.

10 La expresión "microorganismo recombinante" o "microorganismo genéticamente modificado", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una bacteria, es decir, *Escherichia coli*, que no se encuentra en la naturaleza y que es genéticamente distinta de su equivalente que se halla en la naturaleza. Significa que se modifica o bien por introducción o por eliminación o modificación de elementos genéticos. También se puede transformar forzando el desarrollo y la evolución de nuevas vías metabólicas combinando mutagénesis dirigida y una evolución bajo presión de selección específica (véanse, por ejemplo, los documentos WO2004/076659 o WO2007/011939).

15 Un microorganismo puede modificarse para expresar genes exógenos si estos genes se introducen en el microorganismo con todos los elementos que permiten su expresión en el microorganismo hospedante. La modificación o "transformación" de microorganismos con ADN exógeno es una tarea habitual para el experto en la técnica.

Un microorganismo puede modificarse para modular el nivel de expresión de un gen endógeno.

20 La expresión "gen endógeno" significa que el gen estuvo presente en el microorganismo antes de cualquier modificación genética. Los genes endógenos pueden hiperexpresarse introduciendo secuencias heterólogas además de, o para reemplazar elementos reguladores endógenos, o introduciendo una o más copias complementarias en el cromosoma o un plásmido. Los genes endógenos pueden además modificarse para modular su expresión y/o actividad. Por ejemplo, las mutaciones se pueden introducir en la secuencia codificante para
25 modificar el producto génico, o se pueden introducir secuencias heterólogas además de, o reemplazar elementos reguladores endógenos. La modulación de un gen endógeno puede resultar en el aumento de regulación y/o mejora de la actividad del producto génico, o alternativamente, en la disminución de la regulación y/o la reducción de la actividad del producto génico endógeno.

30 Otra forma de modular su expresión consiste en intercambiar el promotor endógeno de un gen (p. ej., promotor de tipo salvaje) con un promotor más fuerte o más débil para aumentar o reducir la regulación de la expresión del gen endógeno. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos. Está dentro de la capacidad del experto en la técnica seleccionar los promotores correctos.

35 Por el contrario, "gen exógeno" significa que el gen se introdujo en un microorganismo por métodos conocidos por el experto en la técnica, dado que este gen no ocurre naturalmente en el microorganismo. Los genes exógenos se pueden integrar al cromosoma hospedante, o expresarse en forma extra-cromosómica por plásmidos o vectores. Una diversidad de plásmidos, que difieren con respecto a su origen de replicación y su número de copias en la célula, se conocen en la técnica. Estos genes pueden ser homólogos.

40 En el contexto de la invención, la expresión "gen homólogo" no está limitada a designar genes que tienen un ancestro genético común teórico, sino que incluye genes que pueden no estar genéticamente relacionados que, sin embargo, han evolucionado para codificar proteínas que desempeñan funciones similares y/o tienen estructura similar. Por consiguiente, la expresión "homólogo funcional" para el propósito de la presente invención se refiere al hecho de que una determinada actividad enzimática no solamente puede ser provista por una proteína específica de secuencia de aminoácidos definida, sino además por proteínas de secuencia similar de otros microorganismos relacionados o no.

45 Usando las referencias expuestas en Genbank para genes conocidos, los expertos en la técnica pueden determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo de rutina se realiza ventajosamente utilizando secuencias de consenso que se pueden determinar llevando a cabo alineaciones de secuencias con genes derivados de otros microorganismos y diseñando sondas degeneradas para clonar el correspondiente gen en otro organismo. El experto en la técnica conoce estos métodos de rutina de
50 biología molecular.

La expresión "mejoría de la producción de metionina", "mejorar la producción de metionina" y sus equivalentes gramaticales, como se emplean en la presente memoria, se refieren a un aumento de la producción de metionina/fuente de carbono (relación de gramo/mol de metionina producida por gramo/mol de fuente de carbono consumido que se puede expresar en porcentaje) y/o a una mejor pureza de la metionina producida. En la presente
55 invención, la pureza de la metionina producida se puede aumentar reduciendo la producción de cetometilvalerato y/o de homolantionina. Los expertos en la técnica conocen los métodos para determinar la cantidad de fuente de

carbono consumido y de metionina producida. La producción y/o la pureza de la metionina producida son mayores en el microorganismo recombinante comparado con el correspondiente microorganismo no modificado.

5 La expresión "microorganismo optimizado para la producción fermentativa de metionina" se refiere a microorganismos evolucionados y/o genéticamente modificados para presentar una mejor producción de metionina en comparación con la producción endógena de los correspondientes microorganismos de tipo salvaje. Dichos microorganismos "optimizados" para la producción de metionina se conocen en la técnica y se han descrito en particular en las solicitudes de patentes WO2005/111202, WO2007/077041, WO2009/043803 y WO2012/098042.

10 De acuerdo con la invención, las expresiones "producción fermentativa", "cultivo" o "fermentación" se emplean para indicar el crecimiento de bacterias. Este crecimiento en general se lleva a cabo en fermentadores con un medio de cultivo adecuado adaptado al microorganismo que se esté utilizando y contiene por lo menos una fuente de carbono simple, y si es necesario co-sustratos.

15 Un "medio de cultivo adecuado" designa un medio (p. ej., un medio estéril líquido) que comprende nutrientes esenciales o beneficiosos para el mantenimiento y/o el crecimiento de la célula tal como fuentes de carbono o sustratos de carbono, fuentes de nitrógeno, por ejemplo peptona, extractos de levadura, extractos de carne, extractos de malta, urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y fosfato de amonio; fuentes de fósforo, por ejemplo, monofosfato de potasio o difosfato de potasio, oligoelementos (p. ej., sales metálicas), por ejemplo sales de magnesio, sales de cobalto y/o sales de manganeso; así como también factores de crecimiento tales como aminoácidos y vitaminas.

20 La expresión "fuente de carbono" o "sustrato de carbono" de acuerdo con la presente invención indica cualquier fuente de carbono que puede utilizar el experto en la técnica para soportar el crecimiento normal de un microorganismo, incluidos monosacáridos (como glucosa, galactosa, xilosa, fructosa o lactosa), oligosacáridos, disacáridos (como sacarosa, celobiosa o maltosa), melazas, almidón o sus derivados, hemicelulosas y sus combinaciones. Una fuente de carbono simple especialmente preferida es glucosa. Otra fuente de carbono simple preferida es sacarosa. La fuente de carbono puede provenir de materia prima renovable. La materia prima renovable se define como materia prima requerida para determinados procesos industriales que se pueden regenerar dentro de un retraso breve y en cantidad suficiente para permitir su transformación al producto deseado. La biomasa vegetal tratada o no es una fuente de carbono renovable interesante.

25 La expresión "fuente de azufre" de acuerdo con la invención se refiere a sulfato, tiosulfato, hidrógeno sulfuro, ditionato, ditionito, sulfito, metilmercaptano, dimetilsulfuro y otros sulfuros cubiertos por metilo o una combinación de distintas fuentes. Más preferiblemente, la fuente de azufre en el medio de cultivo es sulfato o tiosulfato, o una mezcla de estos.

30 La expresión "fuente de nitrógeno" corresponde o bien a una sal de amonio o a gas de amoniaco. La fuente de nitrógeno se provee en la forma de amonio o amoniaco.

35 El término "atenuación" o la expresión "expresión atenuada" significan en este contexto que la expresión de un gen o la producción de una enzima se reducen o suprimen en comparación con el microorganismo no modificado que conduce a una reducción en la concentración intracelular de un ácido ribonucleico, una proteína o una enzima en comparación con el microorganismo no modificado. El experto en la técnica conoce los diferentes medios y métodos para medir la concentración de ácido ribonucleico o concentración de proteína en la célula, incluido por ejemplo el uso de reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para determinar la concentración de ácido ribonucleico y el uso de anticuerpo específico para determinar la concentración de proteína específica.

40 La disminución o supresión de la producción de una enzima se obtiene mediante la atenuación de la expresión del gen que codifica dicha enzima.

45 La atenuación de genes se puede lograr con métodos y medios conocidos por el experto en la técnica. En general, la atenuación de la expresión génica se puede lograr:

- Mutando la región codificante o la región promotora, o,
- Eliminando todo o parte de la región promotora necesaria para la expresión génica, o,
- Eliminando todo o parte de la región codificante del gen por recombinación homóloga, o,
- Insertando un elemento externo a la región codificante a la región promotora, o,
- 50 – Expresando el gen bajo control de un promotor débil o un promotor inducible.

El experto en la técnica conoce una diversidad de promotores que exhiben diferente fortaleza y qué promotor usar para una expresión genética débil o inducible.

El término "actividad" de una enzima se usa de manera intercambiable con el término "función" y designa, en el contexto de la invención, la reacción que es catalizada por la enzima. El experto en la técnica sabe cómo medir la actividad enzimática de dicha enzima.

5 Las expresiones "actividad atenuada" o "actividad reducida" de una enzima significan o bien actividad catalítica específica reducida de la proteína obtenida por mutación en la secuencia de aminoácidos y/o concentraciones reducidas de la proteína en la célula obtenidas por mutación de la secuencia nucleotídica o por eliminación de la región codificante del gen.

10 Las expresiones "actividad mejorada" o "aumento de la actividad" de una enzima designan o bien un aumento de la actividad catalítica específica de la enzima y/o un aumento de la cantidad/biodisponibilidad de la enzima en la célula, obtenida por ejemplo por hiperexpresión del gen que codifica la enzima.

15 Las expresiones "aumento de la expresión", "expresión mejorada" o "hiperexpresión" y sus equivalentes gramaticales se utilizan de manera intercambiable en el texto y tienen un significado similar. Estos términos indican que la expresión de un gen o la producción de una enzima aumenta en comparación con el microorganismo no modificado que produce un incremento en la concentración intracelular de un ácido ribonucleico, una proteína o una enzima en comparación con el microorganismo no modificado. El experto en la técnica conoce diferentes medios y métodos para medir la concentración de ácido ribonucleico o la concentración de proteína en la célula, en donde la célula incluye por ejemplo el uso de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para determinar la concentración de ácido ribonucleico y el uso de anticuerpo específico para determinar la concentración de proteína específica.

20 El aumento de la producción de una enzima se obtiene aumentando la expresión del gen que codifica dicha enzima. Para aumentar la expresión de un gen, el experto en la técnica conoce distintas técnicas, como:

- Aumentar la cantidad de copias del gen en el microorganismo. El gen se codifica en forma cromosómica o extracromosómica. Cuando el gen se localiza en el cromosoma, varias copias del gen pueden introducirse en el cromosoma por métodos de recombinación, conocidos por el experto en el campo (incluido reemplazo de genes).
- 25 Cuando el gen se localiza en forma extra-cromosómica, puede ser transportado por distintos tipos de plásmidos que difieren con respecto a su origen de replicación y por lo tanto su número de copias en la célula. Estos plásmidos están presentes en el microorganismo en 1 a 5 copias, o aproximadamente 20 copias, o hasta 500 copias, dependiendo de la naturaleza del plásmido: Un plásmido con número de copias bajo con replicación ajustada (p. ej., para *E. coli* pSC101, RK2), plásmidos con números de copias bajos (p. ej., para *E. coli* pACYC, pRSF 1010) o plásmidos de números de copias altos (p. ej., para *E. coli* pSK bluescript II).
- Usar un promotor que produce un alto nivel de expresión del gen. El experto en la técnica conoce qué promotores son los más convenientes, por ejemplo, promotores *P_{trc}*, *P_{tac}*, *P_{lac}*, o el promotor lambda *cl* se utilizan en gran medida. Estos promotores pueden ser "inducibles" por un compuesto particular o por una condición externa específica como temperatura o luz. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos.
- 35 – Atenuar la actividad o la expresión de un represor de transcripción o la expresión de un represor de transcripción, específico o no específico del gen.
- Usar elementos que estabilizan el correspondiente ARN mensajero (Carrier y Keasling, 1999) o elementos que estabilizan la proteína (p. ej., etiquetas GST, GE Healthcare).

40 La expresión "que codifica" se refiere al proceso mediante el cual un polinucleótido, a través de los mecanismos de transcripción y traducción, produce una secuencia de aminoácidos. El gen(es) que codifica la enzima(s) puede ser exógeno o endógeno.

45 Las expresiones "sensibilidad a la retroalimentación" o "inhibición de la retroalimentación" se refieren a un control del mecanismo celular en donde una o varias enzimas que catalizan la producción de una sustancia particular en la célula son inhibidas o están menos activas cuando la sustancia se ha acumulado hasta un cierto nivel. Entonces las expresiones "sensibilidad de retroalimentación reducida" o "inhibición de retroalimentación reducida" significan que la actividad de dicho mecanismo se reduce o suprime en comparación con un microorganismo no modificado. El experto en la técnica sabe cómo modificar la enzima para obtener este resultado. Dichas modificaciones se han descrito en la solicitud de patente WO2005/111202 o en la patente US7.611.873. En un primer aspecto de la invención, se optimiza un microorganismo recombinante, es decir, *Escherichia coli*, para la producción fermentativa de metionina y/o sus derivados, mejorando la actividad de la metionina sintasa dependiente de cobalamina y mejorando el flujo de metionina en dicho microorganismo.

50 Como se describió anteriormente, la actividad de la metionina sintasa dependiente de cobalamina es mediada por la enzima MetH. Esta enzima necesita un sistema de reactivación para tener actividad sostenida. Este sistema es codificado por dos genes, *fldA* y *fpr* en *E. coli*. En esta solicitud, los términos "MetH y su sistema de reactivación" o "metH, fldA, fpr" se refieren a la metionina sintasa dependiente de cobalamina y su sistema de reactivación en *E. coli* o sus genes codificantes de *E. coli*

Por lo tanto, la mejora de la actividad de la metionina sintasa dependiente de cobalamina preferiblemente se lleva a cabo por hiperexpresión del gen *metH* y también de su sistema de reactivación codificado por los genes *fldA* y *fpr*.

5 En una realización de la invención, la actividad de metionina sintasa dependiente de cobalamina se potencia por hiperexpresión (potenciando su expresión) de los genes *metH*, *fldA*, *fpr* de *E. coli*. Preferiblemente, estos genes se hiperexpresan bajo un promotor diferente de su promotor de tipo salvaje.

Más preferiblemente, los genes *metH*, *fldA* o *fpr* se expresan en forma cromosómica, es decir, estos genes se hiperexpresan a partir del cromosoma. Se introducen una o varias copias complementarias de cada gen en el cromosoma del microorganismo. Se integran en distintos locus seleccionados entre la lista descrita en la solicitud de patente WO2011 /073122, y en donde las eliminaciones no tienen un impacto sobre la producción de metionina. La copia de tipo salvaje de la secuencia codificante de cada gen se conserva, pero su región promotora puede reemplazarse con un promotor artificial y/o un sitio de unión al ribosoma (RBS).

En una realización específica de la invención:

- el gen de tipo salvaje *metH* se conserva con reemplazo de su promotor natural y RBS, y se introducen dos copias adicionales en el cromosoma, y
- 15 – los genes de tipo salvaje *fldA* y *fpr* y sus regiones promotoras se conservan, y se introduce una copia adicional de cada gen en el cromosoma.

Las copias adicionales de los genes introducidos se expresan bajo control del promotor artificial y RBS.

20 En los microorganismos productores de aminoácidos, la metionina se excreta por un transportador de flujo específico. Cabe destacar que en *E. coli* este transportador se denomina YgaZH y está codificado por los genes *ygaZ* y *ygaH*. Los homólogos funcionales de este sistema de flujo de metionina se han identificado en varios otros microorganismos. En la invención, el microorganismo recombinante hiperexpresa los genes *ygaZH* de *E. coli*. Alternativamente, el microorganismo recombinante de la invención puede hiperexpresar homólogos funcionales de transportadores de YgaZH. Las proteínas homólogas de YgaZ y YgaH se presentan respectivamente en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

25 Tabla 1: Proteínas homólogas de YgaZ

Número de acceso	Nombre	Organismo
yp_001455539.1 NC_009792.1. ABV15103.1	proteína hipotética CK0_04031 [Citrobacter koseri ATCCBAA-895]	<i>Citrobacter koseri</i>
WP_005122932.1 EIQ78635.1	proteína de membrana [Shigella flexneri]	<i>Shigella flexneri</i>
YP_007877063.1 AGJ89511.1 WP_015585890.1	proteína hipotética RORB6_24155 [Raoultella ornithinolytica B6]	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
YP_008107733.1 AGN85393.1 WP_020454909.1	proteína de membrana [Enterobacter sp. R4-368]	<i>Enterobacter sp.</i>
WP_004959353.1 EFE95945.1	proteína de membrana [Serratia odorifera]	<i>Serratia odorifera</i>
YP_003884334. ADM99777 .1	1 transportador de aminoácidos [Dickeya dadantii 3937] Erwinia chrysanthemi (cepa 3937)	<i>Dickeya dadantii</i>
YP_006647984.1 AFR04731.1	transportador de aminoácidos [Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum PCC21]	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i>
YP_001007412.1 CAL13268. 1	transportador de aminoácidos putativo [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>Enterocolitica</i>

ES 2 693 789 T3

Número de acceso	Nombre	Organismo
NP_928590.1 CAE13573.1	proteína hipotética plu 1279 [Photorhabdus luminescens subsp. laumondii TT01]	<i>Photorhabdus luminescens subsp. Laumondii</i>
WP_004847360.1 EHM42581.1	proteína de membrana [Hafnia alvei]	<i>Hafnia alvei</i>
WP_016157304.1 EOQ28426.1	proteína de membrana interior YgaZ [Citrobacter sp. KTE32]	<i>Citrobacter sp. KTE32</i>
WP_006687199.1 EFE06904.1	proteína de membrana [Citrobacter youngae] proteína de resistencia a azaleucina putativa AzIC [Citrobacter youngae ATCC 29220]	<i>Citrobacter youngae</i>
YP_005198838.1 AEX50698.1	permeasa de aminoácidos ramificados putativa (resistencia a azaleucina) [Rahnella aquatilis CIP 78.65 = ATCC 33071]	<i>Rahnella aquatilis</i>
WP_009111644.1 EHD20336.1.	proteína de membrana [Brenneria sp. EniD312]	<i>Brenneria sp.</i>
yp_003469114.1 CBJ82350.1	transportador de aminoácidos [Xenorhabdus bovienii SS-2004]	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
WP_000841919.1	proteína de membrana [Shigella flexneri]	<i>Shigella flexneri</i>
WP_000445647.1	proteína de membrana [Shigella dysenteriae]	<i>Shigella dysenteriae</i>
WP_000445645.1	proteína de membrana [Shigella flexneri]	<i>Shigella flexneri</i>
EFP71467.1	proteína de la familia azIC [Shigella dysenteriae 1617]	<i>Shigella dysenteriae</i>
WP_005063865.1	proteína de membrana [Shigella flexneri]	<i>Shigella flexneri</i>
WP_001428008.1	proteína de membrana [Shigella dysenteriae]	<i>Shigella dysenteriae</i>
WP_005031133.1	proteína de membrana [Shigella dysenteriae]	<i>Shigella dysenteriae</i>
WP_004993748.1	proteína de membrana [Shigella boydii]	<i>Shigella boydii</i>
WP_005099151.1	proteína de membrana [Shigella flexneri]	<i>Shigella flexneri</i>
NP_708495.1	proteína hipotética SF2709 [Shigella flexneri 2a str. 301]	<i>Shigella flexneri</i>
YP_409184.1. NC_007613.1.1. ABB67356	proteína hipotética SBO_2835 [Shigella boydii Sb227]	<i>Shigella boydii</i>
WP_005119769.1	permeasa de aminoácidos de cadena ramificada [Shigella flexneri]	<i>Shigella flexneri</i>
WP_003825971.1	proteína de membrana [Citrobacter sp. 30_2]	<i>Citrobacter sp.</i>

ES 2 693 789 T3

Número de acceso	Nombre	Organismo
WP_016154156.1	proteína de membrana interior YgaZ [Citrobacter sp. KTE151]	<i>Citrobacter sp.</i>
WP_003839672.1	proteína hipotética [Citrobacter freundii]	<i>Citrobacter freundii</i>
WP_016150871.1	proteína de membrana interior YgaZ [Citrobacter sp. KTE30]	<i>Citrobacter sp.</i>
WP_019077531.1	proteína de membrana [Citrobacter freundii]	<i>Citrobacter freundii</i>
WP_003037292.1	proteína de membrana [Citrobacter sp. L17]	<i>Citrobacter sp.</i>
WP_009652545.1	proteína de membrana [Klebsiella sp. OBRC7]	<i>Klebsiella sp.</i>
WP_004853460.1	proteína de membrana [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
YP_005016079.1	proteína de la familia AzIC [Klebsiella oxytoca KCTC 1686]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
WP_004866792.1	proteína de membrana [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
WP_017459327.1	proteína de membrana [Enterobacter cloacae]	<i>Enterobacter cloacae</i>
WP_004205700.1	proteína de la familia azIC [Klebsiella pneumoniae]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
CDA02044.1	proteína de la familia azIC [Klebsiella variicola CAG:634]	<i>Klebsiella variicola</i>
WP_004123979.1	proteína de membrana [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
WP_004132932.1	proteína de la familia AzIC [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
WP_017900616.1	proteína de membrana [Klebsiella pneumoniae]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
YP_002236980.1	proteína de la familia AzIC [Klebsiella pneumoniae 342]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
YP_005228384.1	proteína de transporte de aminoácidos putativa [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>
YP_001336647.1	proteína de transporte de aminoácidos putativa [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578]	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>
WP_016947585.1	proteína de membrana [Klebsiella pneumoniae]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
YP_005956056.1	proteína de transporte de aminoácidos putativa [Klebsiella pneumoniae KCTC 2242]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
WP_020803754.1	proteína de membrana interior YgaZ [Klebsiella pneumoniae]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
WP_016161678.1	proteína de membrana interior YgaZ [Klebsiella sp.]	<i>Klebsiella sp.</i>

ES 2 693 789 T3

Número de acceso	Nombre	Organismo
	KTE92]	
WP_004174723.1	proteína de membrana [Klebsiella pneumoniae]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
WP_004114705.1	proteína de membrana [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
YP_007990259.1	ygaZ [Klebsiella pneumoniae]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
WP_004104780.1	proteína de membrana [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
WP_007370573.1	proteína de membrana [Kosakonia radicincitans]	<i>Kosakonia radicincitans</i>
WP_007370573.1	proteína de membrana [Kosakonia radicincitans]	<i>Kosakonia radicincitans</i>
NP_668256.1	proteína hipotética y0925 [Yersinia pestis KIM10+]	<i>Yersinia pestis</i>
WP_005119769.1	permeasa de aminoácidos de cadena ramificada [Shigella flexneri]	<i>Shigella flexneri</i>
YP_069400.1	subunidad grande del exportador de aminoácidos de cadena ramificada de la familia LIV-E [Yersinia pseudotuberculosis IP 32953]	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
WP_017893772.1	proteína de membrana [Serratia sp. S4]	<i>Serratia sp.</i>
YP_001479963.1	proteína de la familia AzlC [Serratia proteamaculans 568]	<i>Serratia proteamaculans</i>
WP_005189088.1	proteína de membrana [Yersinia intermedia]	<i>Yersinia intermedia</i>
YP_004297214.1	transportador de aminoácidos putativo [Yersinia enterocolitica subsp. palearctica 105.5R(r)]	<i>Yersinia enterocolitica subsp. Palearctica</i>
WP_019081387.1	proteína de membrana [Yersinia enterocolitica]	<i>Yersinia enterocolitica</i>
WP_004392936.1	proteína de membrana [Yersinia kristensenii]	<i>Yersinia kristensenii</i>
WP_016929851.1	proteína de membrana [Serratia marcescens]	<i>Serratia marcescens</i>
WP_019845222.1	proteína de membrana [Dickeya zeae]	<i>Dickeya zeae</i>
YP_003334823.1	proteína de la familia AzlC [Dickeya dadantii Ech586]	<i>Dickeya dadantii</i>
YP_003042011.1	proteína hipotética conservada [Photorhabdus asymbiotica]	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>
WP_016941678.1	proteína de membrana [Dickeya zeae]	<i>Dickeya zeae</i>
WP_005274999.1	proteína de membrana [Yersinia bercovieri]	<i>Yersinia bercovieri</i>
CAC44347.1	proteína YgaZ [Erwinia chrysanthemi]	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
WP_004704053.1	proteína de membrana [Yersinia aldovae]	<i>Yersinia aldovae</i>

ES 2 693 789 T3

Número de acceso	Nombre	Organismo
YP_003003219.1	proteína de la familia AzIC [Dickeya zeae Ech1591]	<i>Dickeya zeae</i>
WP_004707388.1	proteína de membrana [Yersinia frederiksenii]	<i>Yersinia frederiksenii</i>
WP_008812528.1	proteína de membrana [Enterobacteriaceae bacterium 9_2_54FAA]	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>
YP_008231812.1	proteína de membrana [Serratia liquefaciens ATCC 27592]	<i>Serratia liquefaciens</i>
YP_051597.1	transportador de aminoácidos [Pectobacterium atrosepticum SCRI1043]	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
WP_019455591.1	proteína de membrana [Serratia marcescens]	<i>Serratia marcescens</i>
YP_007407667.1 AGE19648.1 NC_020211.1.	transportador de aminoácidos putativo YgaZ [Serratia marcescens WW4]	<i>Serratia marcescens</i>
WP_004716726.1	proteína de membrana [Yersinia rohdei]	<i>Yersinia rohdei</i>
YP_003018879.1	proteína de la familia AzIC [Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum PC1]	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i>
WP_004873538.1	proteína de membrana [Yersinia mollaretii]	<i>Yersinia mollaretii</i>
WP_005975645.1	proteína de membrana [Pectobacterium wasabiae]	<i>Pectobacterium wasabiae</i>
YP_003260827.1	proteína de la familia AzIC [Pectobacterium wasabiae WPP163]	<i>Pectobacterium wasabiae</i>
YP_002986523.1	proteína de la familia AzIC [Dickeya dadantii Ech703]	<i>Dickeya dadantii</i>
YP_007345875.1 AGB83690.1	permeasa de aminoácidos de cadena ramificada putativa (resistencia a azaleucina) [Serratia marcescens FGI94]	<i>Serratia marcescens</i>
YP_004211503.1	proteína de la familia AzIC [Rahnella sp. Y9602]	<i>Rahnella</i> sp.
YP_005400523.1	proteína de la familia AzIC [Rahnella aquatilis HX2]	<i>Rahnella aquatilis</i>
WP_010305354.1	proteína de membrana [Pectobacterium carotovorum]	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
WP_010848732.1	proteína hipotética conservada [Xenorhabdus nematophila]	<i>Xenorhabdus nematophila</i>
YP_003711585.1 CBJ89380.1	proteína hipotética XNC1_1315 [Xenorhabdus nematophila ATCC 19061]	<i>Xenorhabdus nematophila</i>
YP_006500218.1 AFN33798.1	proteína hipotética A225_4537 [Klebsiella oxytoca E718]	<i>Klebsiella oxytoca</i>

ES 2 693 789 T3

Número de acceso	Nombre	Organismo
EHT06520.1	proteína de membrana interior YgaZ [Klebsiella oxytoca 10-5246]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
EKP29343.1	proteína de la familia AzIC [Klebsiella oxytoca M5a]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
EJK15416.1	proteína de transporte de aminoácidos putativa [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae KPNIH18]	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. Pneumoniae</i>
YP_006500218.1	proteína hipotética A225_4537 [Klebsiella oxytoca E718]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
YP_002920871.1	proteína de transporte de aminoácidos putativa [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044]	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. Pneumoniae</i>
YP_003437997.1	proteína de la familia AzIC [Klebsiella variicola At-22]	<i>Klebsiella variicola</i>
YP_003260827.1	proteína de la familia AzIC [Pectobacterium wasabiae WPP163]	<i>Pectobacterium wasabiae</i>
WP_010305354.1	proteína de membrana [Pectobacterium carotovorum]	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
YP_404404.1 ABB62913.1	proteína hipotética SDY_2877 [Shigella dysenteriae Sd197]	<i>Shigella dysenteriae</i>
YP_311671.1. NC_007384.1. AAZ89436.1	proteína hipotética SSON_2826 [Shigella sonnei Ss046]	<i>Shigella sonnei</i>

Tabla 2: Proteínas homólogas de YgaH

Número de acceso	Nombre	Organismo
YP_001455540.1 ABV15104.1	proteína hipotética CKO_04032 [Citrobacter koseri ATCC BAA-895]	<i>Citrobacter koseri</i>
WP_005122930.1 EIQ78634.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Shigella flexneri]	<i>Shigella flexneri</i>
YP_007877062.1 AGJ89510.1	exportador de L-valina [Raoultella ornithinolytica B6]	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
YP_008107734.1 WP_020454910.1 AGN85394.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Enterobacter sp. R4-368]	<i>Enterobacter sp.</i>
WP_004959351.1 EFE95944.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Serratia odorifera]	<i>Serratia odorifera</i>
YP_003884335.1 ADM99778.1	proteína hipotética Dda3937_00895 [Dickeya dadantii 3937]	<i>Dickeya dadantii</i>

ES 2 693 789 T3

Número de acceso	Nombre	Organismo
YP_006647985.1 AFR04732.1	proteína hipotética PCC21_033290 [Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum PCC21]	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i>
YP_001007413.1 CAL13269.1	proteína hipotética YE3239 [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i>
NP_928589.1 CAE13572.1	proteína hipotética plu1278 [Photorhabdus luminescens subsp. laumondii TTO1]	<i>Photorhabdus luminescens subsp. laumondii</i>
WP_004847362.1 EHM42582.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Hafnia alvei]	<i>Hafnia alvei</i>
WP_016154157.1 EOQ28427.1 EOQ47452.1	exportador de L-valina [Citrobacter sp. KTE32]	<i>Citrobacter sp.</i>
WP_006687198.1 EFE06903.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Citrobacter youngae]	<i>Citrobacter youngae</i>
YP_005198837.1 AEX50697.1	proteína de transporte de aminoácidos de cadena ramificada AzID [Rahnella aquatilis CIP 78.65 = ATCC 33071]	<i>Rahnella aquatilis</i>
WP_009111643.1 EHD20335.1.	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada e [Brenneria sp. EniD312]	<i>Brenneria sp. EniD312</i>
YP_003469115.1 CBJ82351.1	transportador [Xenorhabdus bovienii SS-2004]	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
NP_708496.1	exportador de L-valina [Shigella flexneri 2a str. 301]	<i>Shigella flexneri</i>
YP_409183.1. NC_007613.1. ABB67355.1.	proteína hipotética conservada [Shigella boydii Sb227]	<i>Shigella boydii</i>
WP_000119765.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Shigella flexneri]	<i>Shigella flexneri</i>
WP_003825969.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Citrobacter sp. 30_2]	<i>Citrobacter sp.</i>
WP_003037297.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Citrobacter freundii]	<i>Citrobacter freundii</i>
WP_003037297.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Citrobacter freundii]	<i>Citrobacter freundii</i>
EKU35015	subunidad pequeña de aminoácidos ramificados de la familia liv-e [Citrobacter sp. L17]	<i>Citrobacter sp.</i>
WP_009652550.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Klebsiella sp. OBRC7]	<i>Klebsiella sp.</i>
WP_004853462.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>

ES 2 693 789 T3

Número de acceso	Nombre	Organismo
YP_005016080.1	exportador de L-valina putativa [Klebsiella oxytoca KCTC 1686]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
WP_017459326.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Enterobacter cloacae]	<i>Enterobacter cloacae</i>
WP_004205699.1	exportador de L-valina [Klebsiella pneumoniae]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
WP_004123982.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
WP_004132928.1	exportador de L-valina [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
YP_002236979.1	proteína hipotética KPK_1115 [Klebsiella pneumoniae 342]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
YP_005228385.1	proteína hipotética KPHS_40850 [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>
YP_001336648.1	proteína hipotética KPN_03012 [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578]	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>
YP_005956057.1. NC_017540.1.	exportador de L-valina putativa [Klebsiella pneumoniae KCTC 2242]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
WP_020803764.1	proteína hipotética [Klebsiella pneumoniae]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
WP_004114708.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
WP_004104783.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Klebsiella oxytoca]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
WP_007370572.1 EJI192176.1	proteína de la familia de transporte de aminoácidos de cadena ramificada [Kosakonia radicincitans]	<i>Kosakonia radicincitans</i>
EJI93105.1	proteína de la familia de transporte de aminoácidos de cadena ramificada [Enterobacter radicincitans DSM 16656]	<i>Enterobacter radicincitans</i>
NP_668255.1	proteína hipotética y0924 [Yersinia pestis KIM10+]	<i>Yersinia pestis</i>
YP_069399.1	proteína hipotética YPTB0858 [Yersinia pseudotuberculosis IP 32953]	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
YP_001479964.1	proteína hipotética Spro_3740 [Serratia proteamaculans 568]	<i>Serratia proteamaculans</i>
WP_005189085.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Yersinia intermedia]	<i>Yersinia intermedia</i>
YP_004297213.1	proteína hipotética YE105_C1014 [Yersinia enterocolitica subsp. palearctica 105.5R(r)]	<i>Yersinia enterocolitica subsp. Palearctica</i>

ES 2 693 789 T3

Número de acceso	Nombre	Organismo
WP_019081388.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Yersinia enterocolitica]	<i>Yersinia enterocolitica</i>
WP_004392937.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Yersinia kristensenii]	<i>Yersinia kristensenii</i>
WP_016929852.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Serratia marcescens]	<i>Serratia marcescens</i>
WP_019845221.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Dickeya zeae]	<i>Dickeya zeae</i>
YP_003334824.1	proteína hipotética Dd586_3285 [Dickeya dadantii Ech586]	<i>Dickeya dadantii</i>
YP_003042012.1. NC_012962.1.	proteína hipotética conservada [Photorhabdus asymbiotica]	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>
WP_016941677.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Dickeya zeae]	<i>Dickeya zeae</i>
WP_005275000.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Yersinia bercovieri]	<i>Yersinia bercovieri</i>
CAC44348.1	proteína YgaH [Erwinia chrysanthemi]	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
WP_004704054.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Yersinia aldovae]	<i>Yersinia aldovae</i>
YP_003003218.1	proteína hipotética Dd1591_0860 [Dickeya zeae Ech1591]	<i>Dickeya zeae Ech1591</i>
WP_004707387.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Yersinia frederiksenii]	<i>Yersinia frederiksenii</i>
WP_008812527.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Enterobacteriaceae bacterium 9_2_54FAA]	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>
YP_008231813.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Serratia liquefaciens ATCC 27592]	<i>Serratia liquefaciens</i>
YP_051598.1	proteína hipotética ECA3510 [Pectobacterium atrosepticumSCRI1043]	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
WP_019455592.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Serratia marcescens]	<i>Serratia marcescens</i>
YP_007407668.1	transportador de aminoácidos YgaH putativo [Serratia marcescens WW4]	<i>Serratia marcescens</i>
WP_004716724.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Yersinia rohdei]	<i>Yersinia rohdei</i>
YP_003018880.1.	proteína hipotética PC1_3328 [Pectobacterium]	<i>Pectobacterium carotovorum</i>

ES 2 693 789 T3

Número de acceso	Nombre	Organismo
NC_012917.1.	carotovorum subsp. carotovorum PC1]	<i>subsp. Carotovorum</i>
WP_004873539.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Yersinia mollaretii]	<i>Yersinia mollaretii</i>
WP_005975643.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada e [Pectobacterium wasabiae]	<i>Pectobacterium wasabiae</i>
YP_003260828.1	proteína hipotética Pecwa_3484 [Pectobacterium wasabiae WPP163]	<i>Pectobacterium wasabiae</i>
YP_002986522.1	proteína hipotética Dd703_0892 [Dickeya dadantii Ech703]	<i>Dickeya dadantii</i>
YP_007345876.1	proteína transportadora de aminoácidos de cadena ramificada (AzID) [Serratia marcescens FGI94]	<i>Serratia marcescens</i>
YP_004211502.1	transportador de aminoácidos de cadena ramificada [Rahnella sp. Y9602]	<i>Rahnella sp.</i>
YP_005400522.1 NC_017047.1.	exportador de L-valina putativa [Rahnella aquatilis HX2]	<i>Rahnella aquatilis</i>
WP_010305358.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Pectobacterium carotovorum]	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
YP_003711584.1. NC_014228.1.	proteína hipotética XNC1_1314 [Xenorhabdus nematophila ATCC 19061]	<i>Xenorhabdus nematophila</i>
YP_006500219.1 AFN29790.1	transporte de aminoácidos de cadena ramificada [Klebsiella oxytoca E718]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
EHT06521.1	proteína hipotética HMPREF9690_03780 [Klebsiella oxytoca 10-5246]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
EKP29342.1.	exportador de L-valina [Klebsiella oxytoca M5a]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
EJK15417.1.	exportador de L-valina putativa [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae KPNIH18]	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>
YP_006500219.1	transporte de aminoácidos de cadena ramificada [Klebsiella oxytoca E718]	<i>Klebsiella oxytoca</i>
BAH64805.1.	proteína hipotética KP1_4275 [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044]-ygaH	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>
YP_003437996.1	proteína hipotética Kvar_1056 [Klebsiella variicola At-22]	<i>Klebsiella variicola</i>
YP_003260828.1	proteína hipotética Pecwa_3484 [Pectobacterium wasabiae WPP163]	<i>Pectobacterium wasabiae</i>
WP_010282658.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Pectobacterium carotovorum]	<i>Pectobacterium carotovorum</i>

Número de acceso	Nombre	Organismo
YP_404405.1. NC_007606.1. ABB62914.1.	proteína hipotética SDY_2878 [Shigella dysenteriae Sd197]	<i>Shigella dysenteriae</i>
WP_000119748.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Shigella dysenteriae]	<i>Shigella dysenteriae</i>
YP_311672.1 AAZ89437.1	proteína hipotética SSON_2827 [Shigella sonnei Ss046]	<i>Shigella sonnei</i>
WP_005150562.1	proteína de membrana putativa [Shigella sonnei]	<i>Shigella sonnei</i>
WP_000119744 .1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Shigella boydii]	<i>Shigella boydii</i>
WP_002427075.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Yersinia pestis]	<i>Yersinia pestis</i>
WP_017491438.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada (gamma proteobacterium WG36)	<i>gamma proteobacterium</i>
WP_002366138.1	proteína de la familia de aminoácidos de cadena ramificada, parcial [Yersinia pestis]	<i>Yersinia pestis</i>

Con el número de acceso descrito en las tablas para cada homólogo, el experto en la técnica puede obtener la secuencia de aminoácidos y su secuencia nucleotídica codificante en las bases de datos NCBI, por ejemplo.

- 5 A partir de la secuencia de aminoácidos o de la secuencia nucleotídica, es una tarea habitual para el experto obtener genes que codifican estos homólogos. Se puede hacer o bien por síntesis artificial del gen que codifica la proteína de interés a partir de su secuencia de aminoácidos o por ampliación PCR de la región codificante de interés a partir del correspondiente ADN genómico. En el contexto de la invención, estos genes se denominan "genes homólogos *ygaZ* o *ygaH*". Las secuencias de estos genes homólogos *ygaZH* se pueden ajustar al sesgo del codón del microorganismo hospedante.
- 10 En una realización específica de la invención, el microorganismo recombinante hiperexpresa los genes *ygaZ* y *ygaH* de *E. coli* que codifican las proteínas cuyas secuencias se describen respectivamente en las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o sus genes homólogos. Preferiblemente, los genes homólogos *ygaZ* y *ygaH* están compuestos por el par de genes que se origina del mismo organismo y compuestos por el gen homólogo de *ygaZ* y el gen homólogo de *ygaH*. No obstante, podrían utilizarse el par desigual de un gen homólogo *ygaZ* de un primer organismo y un gen
- 15 homólogo *ygaH* de un segundo organismo. Preferiblemente, los genes *ygaZH* o sus genes homólogos se hiperexpresan.

Los genes homólogos de *YgaZH* se escogen entre genes que codifican los homólogos de *YgaZ* y *YgaH* descritos respectivamente en la tabla 1 y en la tabla 2. Preferiblemente, los genes homólogos de *ygaZH* se escogen entre genes que codifican homólogos de *YgaZH* de la especie *Citrobacter*, especie *Shigella*, especie *Raoultella*, especie

20 *Enterobacter*, especie *Yersinia* y especie *Photobacterium*. Más preferiblemente, los genes homólogos de *ygaZH* se originan de *Citrobacter koseri*, *Shigella flexneri*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Photobacterium luminescens*, *Citrobacter youngae* o *Citrobacter freundii*. Lo más preferiblemente, los genes homólogos de *ygaZH* se originan de *Citrobacter koseri*, *Citrobacter youngae*, *Citrobacter freundii* o *Enterobacter sp.*

Por consiguiente, los genes homólogos de *ygaZH* preferiblemente se escogen entre genes que codifican el par de homólogo de *YgaZ* y homólogo de *YgaH* definidos respectivamente por: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 de *Citrobacter koseri*, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 de *Shigella flexneri*, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 de *Raoultella ornithinolytica*, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 de *Enterobacter sp.* (R4-368), SEQ ID NO: 11 o 12 y SEQ ID NO: 13 o 14 de *Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica*, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 de *Photobacterium luminescens subsp. laumondii*, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 de *Citrobacter youngae*, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 de

30 *Citrobacter freundii*.

En una realización preferida de la invención, estos genes *ygaZH* o genes homólogos provenientes de *Citrobacter koseri*, *Shigella flexneri*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Photobacterium luminescens*, *Citrobacter youngae* o *Citrobacter freundii* se hiperexpresan bajo el control de un promotor inducible. El experto en la materia conoce dichos promotores inducibles. Por ejemplo, se pueden emplear promotores como 11..PR o λP_L para hiperexpresar genes *ygaZH* o genes homólogos de *ygaZH* que provienen de *Citrobacter koseri*, *Shigella flexneri*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Photobacterium luminescens*, *Citrobacter youngae* o *Citrobacter freundii* en el microorganismo recombinante de la invención.

Es otro objeto de la invención identificar genes homólogos de *ygaZH* e hiperexpresar dichos genes en microorganismos productores de aminoácidos, solos o en combinación con otras modificaciones genéticas que se describen a continuación.

Optimización de la vía de biosíntesis de metionina

El microorganismo recombinante de acuerdo con la invención se modifica mejorando la producción de metionina. Los genes implicados en la producción de metionina se conocen en la técnica y comprenden genes implicados en la vía de biosíntesis específica de metionina, además de genes implicados en las vías que proporcionan precursores y genes implicados en las vías de consumo de metionina.

La producción eficiente de metionina requiere la optimización de la ruta específica de metionina y varias vías que proporcionan precursores. Las cepas productoras de metionina ya se han descrito, en particular en las solicitudes de patentes WO2005/111202, WO2007/077041 y WO2009/043803.

Excepto que se indique lo contrario, todos los genes mencionados a continuación con respecto a la optimización de la vía de biosíntesis de metionina se refieren a aquellos de *E. coli*.

En una realización específica de la invención, el microorganismo recombinante se modifica como se describe a continuación: aumenta la expresión de por lo menos un gen seleccionado entre *ptsG*, *pyc*, *pntAB*, *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *metF*, *metA*, alelo *metA* * que codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina, *thrA*, y el alelo *thrA** que codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina.

- *ptsG* codifica la enzima PTS IICB^{Glc} como se describe en la solicitud de patente WO2013/001055,
- *pyc* codifica una piruvato carboxilasa como se describe en la solicitud de patente WO2013/001055. En una realización preferida, el gen *pyc* es heterólogo y se selecciona entre los genes *pyc* de las especies *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas fluorescens* o *Corynebacterium*,
- *pntAB* codifica las subunidades de una transhidrogenasa unida a membrana, como se describe en la solicitud de patente WO2012/055798,
- *cysP* codifica una proteína unida a sulfato periplásmico, como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803,
- *cysU* codifica un componente del transportador ABC de sulfato, como se describe en el documento WO2007/077041 y en el documento WO2009/043803,
- *cysW* codifica una proteína de transporte de sulfato unida a membrana, como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803,
- *cysA* codifica una sulfato permeasa, como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803,
- *cysM* codifica una O-acetil serina sulfhidralasa, como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803,
- *cysI* y *cysJ* codifican respectivamente las subunidades alfa y beta de una sulfito reductasa como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803. Preferiblemente, *cysI* y *cysJ* se hiperexpresan juntos,
- *cysH* codifica una adenililsulfato reductasa, como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803.

Aumentar el metabolismo de C1 es también una modificación que produce una mejor producción de metionina. También se relaciona con el incremento de la actividad de por lo menos una enzima implicada en el metabolismo de C1 seleccionada entre GcvTHP, Lpd, MetF o MetH. En una realización preferida de la invención, el metabolismo de carbono aumenta potenciando la expresión y/o la actividad de por lo menos uno de los siguientes:

- *gcvT*, *gcvH*, *gcvP* y *lpd*, codifican el complejo de escisión de glicina, como se describe en la solicitud de patente WO 2007/077041. El complejo de escisión de glicina (GCV) es un complejo multienzimático que cataliza la oxidación de glicina, produciendo dióxido de carbono, amoniaco, metileno-THF y un piridina nucleótido

reducido. El complejo GCV consiste en cuatro componentes de proteína, glicina deshidrogenasa, proteína P (GcvP), proteína lipoil-GcvH, proteína H (GcvH), aminometiltransferasa, proteína T (GcvT) y dihidrolipoamida deshidrogenasa, proteína L (GcvL o Lpd). La proteína P cataliza la liberación dependiente de fosfato piridoxal de CO₂ de glicina, dejando un resto metilamina. El resto metilamina se transfiere al grupo ácido lipoico de la proteína H, que se une a la proteína P antes de la descarboxilación de glicina. La proteína T cataliza la liberación de NH₃ del grupo metilamina y transfiere el resto de la unidad C1 a THF, formando metileno-THF. La proteína L luego oxida el componente de ácido lipoico de la proteína H y transfiere los electrones a NAD⁺, formando NADH;

- *MetF* codifica una metilnotetrahidrofolato reductasa, como se describe en la solicitud de patente WO2007/07704.

La hiperexpresión de por lo menos uno de los siguientes genes implicados en la biosíntesis de serina también reduce la producción de la isoleucina secundaria:

- *serA* que codifica una fosfoglicerato deshidrogenasa, como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803,
- *serB* que codifica una fosfoserina fosfatasa, como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803,
- *serC* que codifica una fosfoserina aminotransferasa, como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803.

La hiperexpresión de los siguientes genes ya ha demostrado mejorar la producción de metionina:

- *cysE* codifica una serina aciltransferasa; su hiperexpresión permite un incremento en la producción de metionina, como se describe en el documento WO2007/077041;
- *metA* codifica una homoserina succiniltransferasa. El alelo *metA** codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina. Preferiblemente, se usa el alelo *metA** descrito en la solicitud de patente WO2005/111202;
- *thrA* codifica una aspartocinasa/homoserina deshidrogenasa; el alelo *thrA** codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina, como se describe en el documento WO2005/111202.

En una realización específica de la invención, por lo menos uno de dichos genes está bajo el control de un promotor inducible. En una realización preferida de la invención, por lo menos uno de estos genes está bajo el control de un promotor inducible de temperatura. Preferiblemente, la expresión de por lo menos uno de los genes: *thrA*, *cysE*, *metA*, está bajo el control de un promotor inducible, directamente o indirectamente. Más preferiblemente, los genes *thrA*, *cysE* y *metA* están bajo el control de un promotor inducible, directa o indirectamente. En una realización preferida de la invención, la expresión del gen *thrA* está bajo el control directo de un promotor inducible y la expresión del gen *cysE* está bajo el efecto polar de la expresión inducible del gen *thrA*. En otra realización preferida de la invención, la expresión del gen *thrA* está bajo el control directo de un promotor inducible y las expresiones de los genes *cysE* y *metA* están bajo el efecto polar de la expresión inducible del gen *thrA*.

En una realización más preferida, el promotor inducible de temperatura pertenece a la familia de promotores P_R. Una cepa productora de metionina que tiene genes bajo el control de promotores inducibles se describe en la solicitud de patente WO2011/073122.

En otra realización específica de la invención, el microorganismo se ha modificado adicionalmente, y la expresión de por lo menos uno de los siguientes genes se atenúa: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *ybdL*, *yncA*, *metE*, *dgsA*, *metN*, *metI*, *metQ* o *udhA*.

- El gen *metJ* codifica la proteína represora MetJ (GenBank 1790373), responsable de la disminución de la regulación del regulón de metionina como se sugirió en la solicitud de patente JP2000/157267,
- Los genes *pykA* y *pykF* codifican las enzimas 'piruvato cinasa'. La atenuación de la expresión de por lo menos una o ambas piruvato cinasas disminuye el consumo de fosfoenol piruvato (PEP). El aumento de disponibilidad de PEP puede aumentar la producción de oxaloacetato, un precursor importante de aspartato, que a su vez es un precursor de metionina, como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803,
- *purU* codifica una formiltetrahidrofolato desformilasa, una enzima que cataliza la reacción de formil-THF deformilasa. La atenuación de la actividad de deformilasa aumenta la producción de metil-THF requerida para la metilación de homocisteína. La pérdida de metabolitos C1 por deformilación conduce a una mayor producción de homocisteína que no puede transformarse en metionina. La homocisteína puede entonces ser un sustrato para la enzima cistationina gamma sintasa (MetB) que puede catalizar la reacción entre O-succinilhomoserina y

homocisteína, lo que resulta en la producción de homolantionina, como se describe en los documentos WO2007/077041 y WO2009/043803,

- *ybdL* codifica una aminotransferasa como se describe en la solicitud de patente WO2012/090021,
- *yncA* codifica una N-aciltransferasa, como se describe en la solicitud de patente WO2010/020681,
- 5 – *metE* codifica una metionina sintasa independiente de cobalamina, como se describe en la solicitud de patente PCT/IB2012/001336,
- *dgsA*, mejor conocido como Mlc, codifica un regulador dual de transcripción que controla la expresión de genes que codifican las enzimas de los sistemas de fosfotransferasa (PTS) y fosfoenolpiruvato (PEP) como se describe en la solicitud de patente WO2013/001055,
- 10 – *metN*, *metI*, *metQ* codifican un sistema de absorción de metionina,
- *udhA* codifica una piridina nucleótido transhidrogenasa soluble, como se describe en la solicitud de patente WO2012/055798.

En una realización más preferida de la invención, la producción fermentativa de metionina y/o sus derivados por un microorganismo recombinante, en donde la importación de metionina se atenúa y el flujo de metionina se potencia, a partir de glucosa como la fuente de carbono principal, se puede lograr con una combinación de las modificaciones anteriormente analizadas en dicho microorganismo, por ejemplo:

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

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

- los genes *methH*, y *fldA* y *fpr* de *E. coli* o sus genes homólogos de *C. glutamicum* se hiperexpresan,
- los genes *ygaZ* y *ygaH* de *E. coli* o los genes *brnF* y *brnE* de *C. glutamicum* o sus genes homólogos provenientes de *Citrobacter koseri*, *Shigella flexneri*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Photobacterium luminescens*, *Citrobacter youngae* o *Citrobacter freundii* se hiperexpresan,
- la expresión de los genes *metA**, *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP*, *metF*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *thrA**, *ptsG* y *pyc* se potencia, y
- la expresión de los genes *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *metE*, *dgsA* y *yncA* se atenúa.

El microorganismo que se ha de modificar de acuerdo con la presente invención es *Escherichia coli*.

40 Condiciones de cultivo

En un segundo aspecto de la invención, se optimiza un método para la producción fermentativa de metionina y/o sus derivados. Comprende las siguientes etapas:

Cultivar un microorganismo recombinante en donde la actividad de metionina sintasa dependiente de cobalamina y el flujo de metionina se potencian hiperexpresando respectivamente los genes *methH* y los genes *fldA* y *fpr* de *E. coli* y los genes *ygaZH* de *E. coli*

o sus genes homólogos en un medio de cultivo adecuado que comprende una fuente de carbono y una fuente de azufre fermentables, y,

Recuperar metionina y/o sus derivados del medio de cultivo.

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

- 5 Para *E. coli*, el medio de cultivo puede ser de composición idéntica o similar a un medio M9 (Anderson, 1946), un medio M63 (Miller, 1992); o un medio tal como lo definen Schaefer *et al.*, (1999).

En el método de la invención, los genes homólogos a *ygaZH* que se hiperexpresan en el microorganismo recombinante preferiblemente se seleccionan entre el grupo que consiste en genes homólogos de la especie *Citrobacter*, especie *Shigella*, especie *Raoultella*, especie *Enterobacter*, especie *Yersinia* y especie *Photobacterium*, y más preferiblemente provienen de *Citrobacter koseri*, *Shigella flexneri*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Photobacterium luminescens*, *Citrobacter youngae* o *Citrobacter freundii*.

En una realización específica del método, el microorganismo recombinante comprende las siguientes modificaciones genéticas:

- a. hiperexpresión de los genes *metH*, y *fldA* y *fpr* de *E. coli* y
 15 b. hiperexpresión de los genes *ygaZH* de *E. coli* o sus genes homólogos.

En esta realización específica de la invención, dichos genes homólogos de *ygaZH* preferiblemente se escogen entre el grupo que consiste en genes homólogos de la especie *Citrobacter*, especie *Shigella*, especie *Raoultella*, especie *Enterobacter*, especie *Yersinia* y especie *Photobacterium*, y más preferiblemente entre los grupos que consiste en genes homólogos de *Citrobacter koseri*, *Shigella flexneri*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Photobacterium luminescens*, *Citrobacter youngae* o *Citrobacter freundii*.

En el método de la invención, los genes homólogos de *ygaZH* que se hiperexpresan en el microorganismo recombinante más preferiblemente provienen de *Citrobacter koseri*, *Citrobacter youngae*, *Citrobacter freundii* o *Enterobacter sp.*

En alguna realización de la invención, el desarrollo del microorganismo recombinante se somete a una limitación o privación/deficiencia de uno o varios sustratos inorgánicos, es decir, fosfato y/o potasio en el medio de cultivo. Se refiere a la condición bajo la cual el desarrollo de los microorganismos se rige por la cantidad de una sustancia química inorgánica provista que aún permite el desarrollo débil. Dicha limitación en el desarrollo del microorganismo se ha descrito en la solicitud de patente WO2009/043372. En una realización preferida de la invención, el cultivo se somete a limitación de fosfato.

La acción de "recuperar metionina y/o sus derivados del medio de cultivo" designa la acción de recuperar L-metionina y/o uno de sus derivados, en particular N-acetil metionina (NAM) y S-adenosil metionina (SAM) y todos los demás derivados que pueden ser útiles como hidroximetionina (o análogo de metionina hidroxilada o MHA). El experto en la técnica conoce los métodos para la recuperación y purificación de los compuestos producidos (véanse en particular WO2005/007862, WO2005/059155). Preferiblemente, la etapa de recuperar metionina y/o sus derivados comprende las etapas de concentración de metionina y/o sus derivados en el caldo de fermentación.

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

Ejemplos

Los siguientes experimentos demuestran cómo la hiperexpresión de genes que codifican el sistema de expresión de L-metionina junto con la hiperexpresión de genes que codifican metionina sintasa dependiente de B12 y su sistema de reactivación en *E. coli* y (no pertenece a la presente invención) en *C. glutamicum* mejoraron la producción de metionina.

En los ejemplos que se exponen a continuación, se utilizaron métodos conocidos en la técnica para construir cepas de *E. coli* y *C. glutamicum* que contienen vectores de replicación y/o diversas inserciones, eliminaciones y sustituciones cromosómicas usando la recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner, (2000) para *E. coli* y en la patente WO2007012078 para *C. glutamicum*. Del mismo modo, el experto en la técnica conoce el uso de plásmidos o vectores para expresar o hiperexpresar uno o varios genes en microorganismos recombinantes.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* adecuados incluyen pTrc, pACYC184n pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236 etc.

Los ejemplos de vectores de *C. glutamicum* y *E. coli* adecuados son, p. ej., pClik5aMCS (WO2005059093) o se pueden hallar en Eikmanns *et al.*, (1991).

Los ejemplos de vectores adecuados para manipular *Corynebacteria* se pueden hallar en el manual de *Corynebacteria* editado por Eggeling y Bott en 2005.

5 Protocolos

Se han empleado varios protocolos para construir las cepas que producen metionina descritas en los siguientes ejemplos.

10 El protocolo 1 (Modificaciones cromosómicas por recombinación homóloga, selección de recombinantes y escisión de cassettes de antibióticos) y el protocolo 2 (Fago de transducción P1) utilizados en esta invención se han descrito por completo en la solicitud de patente WO2013/001055.

Protocolo 3: Construcción de plásmidos recombinantes

15 La tecnología de ADN recombinante está bien descrita y el experto en la técnica la conoce bien. En síntesis, se amplían por PCR fragmentos de ADN usando oligonucleótidos (el experto en la técnica los puede diseñar) y ADN genómico MG1655 como matriz. Los fragmentos de ADN y el plásmido seleccionado se digieren con enzimas de restricción compatibles, se ligan y luego se transforman en células competentes. Los transformantes se analizan y los plásmidos recombinantes de interés se verifican por secuenciación de ADN.

Tabla 3: Secuencias citadas en los siguientes ejemplos

SEQ ID N°	Secuencia 5' → 3'
21	AACACTGCAAAATCCTGCTATTTGATTTGTATGAGTGATA AGTGTAACGCCGAATAATCGTCGTTGGCGAATTTTACGAC TCTGACAGGAGGTGGCAATG
22	GAGAAAGTAAACGTAACATGATGACGACAATTCTGACGA TTCATGTTCCCTCAACGCCGGGGCGCGCATGGAATATGCT GGTGGCACTTCAGGCAGGAAA
23	TGAGGAATAGACAATGTTAGTTAGTAAAAGCAACGGATT TAACGCTAGCGCAGTTTTGGGTAGTGAAGTTATAATGAA AATAAATCTTCTAAACACATG
24	TGCGCTAAAAGAAATGAATAGAACCTTTTCGATAATATAA GAAAAAGTGATTTTCATGTTGGTTTACTTAAGCCAAGTAG TACGCGTAGTGTTATTTTAG
25	AAATTATCTTGTATCTTTGTTATAATATGGGAAAGTGCA ACCAT
26	CGTTAATCAGCAGGTTAGCCAGCCACAAAAAGCCATTGA GAAAAATTGATTTTACATGGGATTATTATATTGCTAAT CCTTGGTTTTTAAAAATTGTG
27	

SEQ ID N°	Secuencia 5' → 3'
	TCATCTACCGCGCACGAATAAACTGCCATCCGGCTGGCG GGTGAACAGGACCTGTTGATTATTCCCCGTATCAATGGTT AAGCCCGTCACCACGCCGCT

Ejemplo 1: Hiperproducción de la metionina sintasa dependiente de cobalamina o Hiperproducción de un sistema de secreción de L-metionina en un hiperproductor de una cepa recombinante de *E. coli* que hiperproduce L-metionina – Cepa 1 y Construcción de cepas 2, 3, 4, 5 y 6

5 Cepa 1 – Cepa de referencia

La cepa 17 que produce metionina descrita en la solicitud de patente WO2013/001055 (que se incorpora por referencia a esta solicitud) se renombró cepa 1 en la presente solicitud. Como recordatorio, esta cepa hiperexpresó *metH* debido al promotor artificial y al sitio de unión al ribosoma integrados delante del gen *metH* en su locus endógeno (para detalles, véase la solicitud de patente WO2007/077041). Esta cepa contiene también la mutación en el gen *metE* que se describe en la solicitud de patente WO2013/190343.

Construcción de la cepa 5 – Hiperproducción de la metionina sintasa dependiente de cobalamina, hiperexpresión de *metH*, *fldA* y *fpr*

El gen de *E. coli* que codifica metionina sintasa dependiente de cobalamina, *metH* y los genes *fldA* y *fpr* que codifican el sistema de reactivación de MetH, se hiperexpresaron todos en la base genética de la cepa 1.

15 Antes de usar la cepa 1 nuevamente, se extrajo el cassette de antibiótico de la modificación $\Delta dgsA$ usando la recombinasa Flp como lo describen Datsenko & Wanner, 2000 (de acuerdo con el Protocolo 1). Se seleccionaron los transformantes sensibles a kanamicina y se verificó la ausencia de cassette de antibiótico en el locus $\Delta dgsA$ por análisis PCR con oligonucleótidos apropiados. La cepa retenida se denominó cepa 2.

20 Para hiperexpresar *metH*, este gen, operativamente unido al mismo promotor y al sitio de unión al ribosoma descritos en la solicitud de patente WO2007/077041 se integró en el cromosoma en dos locus diferentes *ybeM* y *ypjC* (seleccionados de la lista descrita en la solicitud de patente WO2011/073122 y cuya eliminación no tiene un impacto sobre la producción de metionina).

25 Para hiperexpresar *metH*, se empleó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner, 2000 (de acuerdo con el Protocolo 1). Para ambas integraciones cromosómicas, un fragmento que porta el gen *metH* unido a su promotor artificial y un marcador de resistencia, flanqueados ambos por secuencias de ADN homólogas al locus de integración dirigido *ybeM* o *ypjC* se amplió por PCR superponiendo la técnica de PCR (superposición de oligonucleótidos). Las secuencias para recombinación en *ybeM* y *ypjC* se denominan SEQ ID N° 21 y 22, y SEQ ID N° 23 y 24 (enumeradas en la tabla 3), para *ybeM* y *ypjC* respectivamente. Los productos del análisis PCR " $\Delta ybeM::metH::Km$ " y " $\Delta ypjC::metH::Cm$ " obtenidos se introdujeron luego por electroporación en la cepa MG1655 *metA**11 (pKD46), por separado. Se seleccionaron los transformantes resistentes a antibióticos y la inserción del gen *metH* con el cassette de resistencia en el locus dirigido se verificó por un análisis PCR con oligonucleótidos adecuados. Las cepas retenidas se denominaron MG1655 *metA**11 $\Delta ybeM::metH::Km$ y MG1655 *metA**11 $\Delta ypjC::metH::Cm$. Finalmente, las integraciones cromosómicas $\Delta ybeM::metH::Km$ y $\Delta ypjC::metH::Cm$ se transfirieron por transducción de fago P1 sucesivamente (de acuerdo con el Protocolo 2) de MG1655 *metA**11 $\Delta ybeM::metH::Km$ y MG1655 *metA**11 $\Delta ypjC::metH::Cm$ a la cepa 2. Se seleccionaron transductores resistentes a cloroanfenicol o kanamicina y se verificó la presencia de integraciones cromosómicas $\Delta ybeM::metH::Km$ y $\Delta ypjC::metH::Cm$ por un análisis PCR con oligonucleótidos adecuados. La cepa retenida se denominó cepa 3.

40 Los cassettes de antibióticos se extrajeron de las integraciones cromosómicas efectuadas en los locus *ybeM* y *ypjC* a la cepa 3 usando la recombinasa Flp descrita por Datsenko & Wanner, 2000 (según el Protocolo 1). Se seleccionaron los transformantes sensibles a kanamicina y cloroanfenicol, y se verificó la ausencia de cassette de antibiótico en ambos locus por un análisis PCR con oligonucleótidos adecuados. La cepa retenida se denominó cepa 4.

45 Para hiperexpresar *fldA* y *fpr*, estos genes se unieron operativamente a promotores artificiales y al sitio de unión al ribosoma artificial, y se integraron en el cromosoma en el locus *ytfA* (los mismos criterios de selección que los locus *ybeM* y *ypjC*, ver arriba). Los promotores artificiales se construyeron con la SED ID N° 25 para *fldA* y como se describió para la hiperexpresión del operón *cysPUWAM* en la solicitud de patente WO2009/043803 para *fpr*. Los sitios de unión al ribosoma artificiales son los mismos que se describen para la hiperexpresión del gen *ptsG* en la cepa 17 descrita en la solicitud de patente WO2013/001055.

50 Para agregar copias de hiperexpresión de *fldA* y *fpr* al cromosoma, se empleó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner, 2000 (según el Protocolo 1). Un fragmento que porta los genes *fldA* y

fpr, con sus respectivos promotores, y un marcador de resistencia, ambos flanqueados por la secuencia de ADN homóloga al locus de integración *ytfA* se amplió por PCR superponiendo la técnica de PCR (superposición de oligonucleótidos). Las secuencias para recombinación en el locus *ytfA* se denominan SEQ ID N° 26 y 27 (mencionadas en la tabla 3). El producto PCR "*ΔytfA::fldA-fpr::Km*" obtenido se introdujo luego por electroporación en la cepa MG1655 *metA*11* (pKD46). Los transformantes resistentes a antibióticos se seleccionaron luego, y la inserción de los genes *fldA-fpr* con el cassette de resistencia en el locus *ytfA* se verificó por análisis PCR con oligonucleótidos adecuados.

La cepa retenida se denominó MG1655 *metA*11::ΔytfA::fldA-fpr::Km*. Finalmente, se transfirió la integración cromosómica *ΔytfA::fldA-fpr::Km* por transducción del fago PI (de acuerdo con el Protocolo 2) de MG1655 *metA*11 ΔytfA::fldA-fpr::Km* a la cepa 4. Se seleccionaron los transductores resistentes a kanamicina, y se verificó la presencia de integración cromosómica de *ΔytfA::fldA-fpr::Km* por análisis PCR con oligonucleótidos adecuados. La cepa retenida se denominó cepa 5.

Construcción de la cepa 6 – Hiperproducción del sistema de excreción de L-metionina, hiperexpresión de *ygaZH*

Los genes de *E.coli ygaZH* que codifican el exportador de metionina se hiperexpresaron en la cepa 1. Se clonaron en el número de copias de plásmidos moderado pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990) con el uso del promotor natural de *ygaZ*. Este plásmido se denominó pME1247. Finalmente, el plásmido pME1247 se transformó en la cepa 1, dando la cepa 6.

Ejemplo 2: Hiperproducción de la metionina sintasa dependiente de cobalamina e hiperproducción de un sistema de secreción de L-metionina en una cepa de *E. coli* que hiperproduce L-metionina – Construcción de la cepa 7

Los genes de *E.coli ygaZH* que codifican el exportador de metionina se hiperexpresaron en la cepa 5. El plásmido pME1247 se transformó en la cepa 5, dando origen a la cepa 7.

Ejemplo 3: Hiperproducción de la metionina sintasa dependiente de cobalamina o su sistema de reactivación o hiperproducción de un sistema de secreción de L-metionina en una cepa recombinante de *C.glutamicum* que hiperproduce L- metionina – Construcción de las cepas A a F (este ejemplo no pertenece a la presente invención)

La cepa de *C. glutamicum* ATCC 13032 *hom* ask* meth* (denominada cepa A en lo sucesivo) se describe en la patente WO2007/012078.

En esa cepa A, *hom** y *ask** corresponden a los alelos resistentes a la retroalimentación de homoserina deshidrogenasa que codifica la proteína Hsdh S393F y de aspartato cinasa que codifica la proteína Ask T3111 también llamadas LysC T3111, respectivamente.

Esta cepa A se mutageniza posteriormente con N-Metil-N'-nitroguanidina como se describe en la patente WO2007/012078. Se aíslan los clones que exhiben una titulación de metionina por lo menos dos veces aquella de la cepa A. Uno de dichos clones, utilizado en otros experimentos, se denomina cepa B. Esta cepa B es productora de L-metionina en *C. glutamicum*.

Luego, *C. glutamicum* shai B se modifica como se describe en las patentes WO2007/012078 y W02004/050694 para obtener la cepa C, incluidos *hsk* metY metA metF DmcbR*.

El alelo mutado *hsk** que codifica la homoserina cinasa Hsk T190A se hiperexpresa como también *metY* que codifica la O-acetilhomoserina sulfhidrilasa, *metA* que codifica la homoserina acetil-transferasa, *metF* que codifica la homocisteína metilasa, y el gen *mcbR* se elimina.

Con el fin de aumentar la actividad de metionina sintasa dependiente de cobalamina en *C. glutamicum*, la cepa C productora de L-metionina, *metHcg* (gen *methH* de *C. glutamicum*) se hiperexpresa junto con el gen *fprA1* que codifica ferredoxina reductasa trabajando como proteína de reoxidación de MetH. Estas modificaciones se realizan de acuerdo con la descripción de la patente WO2009/144270. La cepa resultante se denomina cepa D.

Otra forma de aumentar la actividad de metionina sintasa dependiente de cobalamina en la cepa C productora de L-metionina de *C. glutamicum* consiste en hiperexpresar *metHEc* (gen *methH* de *E. coli*) junto con los genes *fldA* y *fpr* de *E. coli* que codifican las flavodoxinas implicadas en la reactivación de la enzima MetH. Esto se logra de acuerdo con la descripción de la patente WO2009/144270. La cepa resultante se denomina cepa E.

Con el fin de aumentar la excreción del sistema de L-metionina específico de *C. glutamicum* en la cepa C, el operón *brnFE* se hiperexpresa a partir del vector lanzadera de *E. coli-C. glutamicum* pEC-XT99A (EP1085094). El plásmido se construyó en *E. coli* a partir de fragmentos generados por PCR usando ADN de *C. glutamicum* ATCC 13032 como molde. El plásmido se construyó como lo describen Trotschel *et al.*, (2005) en pEC-XT99A, y el plásmido resultante pCBI se transformó subsiguientemente en la cepa C que da origen a la cepa F.

Ejemplo 4: Hiperproducción de la metionina sintasa dependiente de cobalamina combinada con hiperproducción de un sistema de secreción de L-metionina en una cepa de *C. glutamicum* que hiperproduce L-metionina – Construcción de las cepas G y H (Este ejemplo no pertenece a la presente invención)

Con el fin de combinar la hiperproducción de MetH_{CG}, FprAl o MetH_{EC}, FldA, Fpr en *C. glutamicum* con la hiperproducción del sistema de expresión de L-metionina específico BrnFE, el plásmido pCBI anteriormente descrito se introduce por electroporación en las cepas D y E, dando origen a las cepas G y H respectivamente.

5 La cepa G porta solamente genes que pertenecen a *C. glutamicum* mientras que la cepa H porta metionina sintasa dependiente de cobalamina y su sistema de reactivación de *E. coli*.

El exportador es en todos los casos BrnFE.

Ejemplo 5: Producción de L-metionina por fermentación en un biorreactor con cepas de *E. coli*

Las cepas descritas en los ejemplos previos se ensayaron bajo condiciones de producción en reactores de 2,5 litros (Pierre Guerin) usando una estrategia de lotes alimentados.

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

15 Se llevó a cabo una tercera etapa de precultivo en biorreactores (Sixfors) rellenos con 200 ml de medio mínimo (B1b) inoculado a una concentración de biomasa de 1,2 g.L⁻¹ con 5 ml de precultivo concentrado. La temperatura de precultivo se mantuvo constante a 34°C y el pH se ajustó automáticamente hasta un valor de 6,8 usando una disolución al 10% de NH₄OH. La concentración de oxígeno disuelto se ajustó continuamente hasta un valor de 30% de la saturación de la presión de aire parcial con suministro de aire y/o agitación. Después de agotar la glucosa del medio del lote, se inició la alimentación del lote alimentado con un caudal inicial de 0,7 ml.h⁻¹, antes de aumentar en forma exponencial durante 26 horas con una velocidad de crecimiento de 0,13 h⁻¹ con el fin de obtener una
20 concentración celular final de aproximadamente 20 g.L⁻¹.

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

Compuesto	Concentración de B1a (g.L ⁻¹)	Concentración de B1b (g.L ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O	0,0130	0,0130
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0015	0,0015
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0150	0,0150
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025	0,0025
H ₃ BO ₃	0,0030	0,0030
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0025	0,0025
Fe(III) citrato H ₂ O	0,1064	0,1064
EDTA	0,0084	0,0084
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00	1,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,08	0,08
Ácido cítrico	1,70	1,70
KH ₂ PO ₄	4,56	4,56
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	2,53	2,53
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,11	1,11

ES 2 693 789 T3

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

Tabla 5: Composición del medio mineral del lote alimentado de precultivo (F1)

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	0,0104
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0012
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0120
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0020
H ₃ BO ₃	0,0024
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0020
Fe(III) citrato H ₂ O	0,0524
EDTA	0,0067
MgSO ₄	5,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,32
Na ₂ SO ₄	8,95
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	24,80
Tiamina	0,01
Glucosa	500,00
Vitamina B12	0,01
NH ₄ OH 28%	Ajustado hasta pH 6,8

Posteriormente, se rellenaron fermentadores de 2,5 L (Pierre Guerin) con 600 o 620 ml de medio mínimo (B2) y se inocularon hasta una concentración de biomasa de $3,2 \text{ g.L}^{-1}$ con un volumen de precultivo que osciló entre 80 y 100 ml.

5 El desarrollo celular es controlado por fosfato, es por eso que la concentración de fosfato final en el medio del lote B2 se ajustó hasta un valor comprendido entre 0 y 20 mM, por adición de distintas concentraciones de KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Del mismo modo, la concentración de fosfato final del medio F2 se ajustó hasta un valor comprendido entre 5 y 30 mM, por adición de distintas concentraciones de KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. La concentración de tiosulfato en el medio del lote alimentado se puede ajustar con el fin de prevenir la privación de este compuesto durante el cultivo.

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

Compuesto	Concentración (g.L^{-1})
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0130
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0015
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0150
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0025
H_3BO_3	0,0030
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025
Fe(III) citrato H_2O	0,1064
EDTA	0,0084
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,08
Ácido cítrico	1,70
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$	7,74
Tiamina	0,01
Vitamina B12	0,01
Biotina	0,10
Glucosa	10
NH_4OH 28%	Ajustado hasta pH 6,8
IPTG	0,0047

Tabla 7: Composición del medio del lote alimentado de cultivo (F2)

Compuesto	Concentración (g.L^{-1})
-----------	-------------------------------------

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O	0,0104
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0012
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0120
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0020
H ₃ BO ₃	0,0024
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0020
Fe(III) citrato H ₂ O	0,0524
EDTA	0,0067
MgSO ₄	5,00
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	60,00
Tiamina	0,01
Vitamina B12	0,01
Biotina	0,10
Glucosa	500
IPTG	0,0047

5 La temperatura del cultivo se mantuvo constante a 37 °C y el pH se mantuvo en el valor de trabajo (6.8) por adición automática de disoluciones de NH₄OH (10% y 28%). La velocidad de agitación inicial se fijó a 200 RPM durante la fase de lote y se aumentó hasta 1000 RPM durante la fase de lote alimentado. El caudal de aire inicial se fijó en 40 NL.h⁻¹ durante la fase de lote y se aumentó a 100 NL.h⁻¹ al comienzo de la fase de lote alimentado. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en valores entre 20 y 40%, preferiblemente 30% de saturación, incrementando la agitación.

10 Se añadió IPTG a los medios de lote y lote alimentado cuando fue necesario en una concentración final de 20 µM. Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos en una concentración de 50 mg.L⁻¹ para espectinomicina, 30 mg.L⁻¹ para cloranfenicol, 50 mg.ml⁻¹ para kanamicina y 100 mg.L⁻¹ para ampicilina.

Cuando la masa de células alcanzó una concentración próxima a 5 g.L⁻¹, comenzó el lote alimentado con un caudal inicial de 5 ml.h⁻¹. La disolución de alimentación se inyectó con un perfil sigmoideo con un caudal en aumento que llegó a 24 ml.h⁻¹ después de 25 horas. Las condiciones de alimentación precisas se calcularon mediante la ecuación:

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

15 en donde Q(t) es el caudal de alimentación en ml.h⁻¹ con p1 = 1,80, p2 = 22,4, p3 = 0,27, p4 = 6,50. Este caudal aumentó de 10 a 50%, preferiblemente entre 20 y 30% durante todo el cultivo.

Después de un lote alimentado durante 25 horas, la bomba de disolución de alimentación cesó y el cultivo finalizó después del agotamiento de la glucosa.

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

después de la siilación. Se ensayó el impacto de la combinación de hiperexpresión de *metH*, *fldA*, *fpr* e hiperexpresión de *ygaZH* en *E. coli*. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Rendimientos de concentraciones máximas y finales de metionina y homolantionina producidos en cultivos de lotes alimentados por distintas cepas.

- 5 Los desempeños de las cepas de interés, las cepas 5, 6 y 7 se compararon con la cepa de referencia 1 y se cultivaron en las mismas condiciones. El símbolo ~ indica que no hay diferencia entre las cepas, el símbolo + indica un incremento entre 1 y 5%, el símbolo ++ indica un incremento entre 5 y 10% y el símbolo +++ indica un incremento mayor que 10%. Para la definición del rendimiento de metionina/glucosa, véase a continuación.

Cepa	Cepa 1	Cepa 6	Cepa 5	Cepa 7
Número de repeticiones	n = 4	n = 1	n = 1	n = 2
Rendimiento máx de metionina	referencia	~	++	+++
Rendimiento final de metionina	referencia	~	~	++
Concentración de homolantionina (mM) en el punto final	14,8	ND	3,6	2,5
Actividad específica de MetH (mUI/mg de proteína)	230	230	1500	ND

10 Estos resultados demuestran que en *E. coli*, la hiperexpresión de genes *ygaZH* solamente es beneficiosa para la producción de metionina (cepa 6). La hiperexpresión del sistema de metionina sintasa dependiente de cobalamina en *E. coli* (cepa 5) conduce a una producción mejorada de metionina. Sorprendentemente, observamos que la combinación de la hiperexpresión de los genes *ygaZH* y el sistema de metionina sintasa dependiente de cobalamina
 15 tiene un efecto sinérgico sobre la producción de metionina, conduciendo a una producción inesperada de metionina. Asimismo, esta combinación tiene un efecto favorable sobre la producción de homolantionina, lo que produce una metionina con mejor pureza.

Determinación del rendimiento de metionina/glucosa (Y_{met})

20 El volumen del reactor se calculó añadiendo al volumen inicial la cantidad de disoluciones añadidas para regular el pH y alimentar el cultivo y restando el volumen utilizado para muestrear y perdido por evaporación.

El volumen del lote alimentado fue continuamente seguido por el pesaje del stock de alimentación. La cantidad de glucosa inyectada se calculó luego en base al peso inyectado, la densidad de la disolución y la concentración de glucosa determinada por el método de Brix ([Glucosa]). La producción de metionina se expresó de la siguiente manera:

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

25 Con Metionina_0 y Metionina_t respectivamente como las concentraciones inicial y final de metionina y V_0 y V_t como los volúmenes t inicial e instantáneo. La glucosa consumida se calculó de la siguiente manera:

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

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

30 $\text{Glucosa consumida}_t = [\text{Glucosa}]_0 * V_0 + \text{Glucosa inyectada} - [\text{Glucosa}]_{residual} * V_t$ con $[\text{Glucosa}]_0$, $[\text{Glucosa}]$, $[\text{Glucosa}]_{residual}$ respectivamente las concentraciones de glucosa, inicial, de alimentación y residual.

Ensayo de actividad de metionina sintasa dependiente de cobalamina

El ensayo de actividad de metionina dependiente de cobalamina es una adaptación del ensayo descrito por Drummond *et al.*, in 1995.

5 La actividad de metionina sintasa dependiente de cobalamina se ensayó midiendo la concentración del producto tetrahidrofolato (H4folate) con un espectrofotómetro en una longitud de onda de 350 nm y una temperatura constante de 37°C.

10 La mezcla de reacción se llevó a cabo en fosfato de potasio 80 mM pH7,2, DTT 20 mM, 15 µM S-adenosilmetionina (SAM), ácido (6R,S)-5-Metil-5,6,7,8-tetrahidrofólico 0,6 mM, Hidroxocobalamina 40 µM, cloruro de zinc 0,1 mM y 8 µg de extracto bruto en un volumen final de 800 µl. La mezcla de reacción se incubó durante 10 min a 37°C antes de comenzar la reacción por adición del sustrato homocisteína en una concentración final de 0,8 mM. Después de 5 min a 37°C, se añadieron 200 µl de disolución de derivación ácida (HCl 4M en ácido fórmico al 60%) para inactivar la rotación, llevando el volumen a 1 ml, y luego los tubos se calentaron a 80°C durante 10 min. Este paso es necesario para estabilizar el producto enzimático de la reacción, el tetrahidrofolato que no es estable en ácido. El calor conduce a la formación del meteniltetrahidrofolato que absorbe luz a 350 nm, mientras que el sustrato residual 5-metiltetrahidrofolato no contribuye a la absorbancia a 350 nm. El blanco de reacción contenía todos los componentes de la mezcla de reacción excepto el sustrato de homocisteína.

15 **Quantificación de los niveles de proteínas FldA y Fpr**

Con el fin de cuantificar las dos proteínas, se generaron anticuerpos contra flavodoxina-1 (fldA) y flavodoxina reductasa (fpr) (Anticuerpos de conejo, Eurogentec) y se usaron en experimentos de inmunotransferencia Western blot. La detección Western blot se llevó a cabo usando AP anti-conejo de cabra. Los niveles de proteína de FldA y Fpr en las manchas se cuantificaron con un sistema de obtención de imágenes comercial (Epson Expression 1680 professional) y se compararon en las diferentes cepas descritas en esta patente.

Ejemplo 6: Producción de L-metionina por fermentación con cepas de *C. glutamicum* (Este ejemplo no pertenece a la presente invención)

25 Se cultivan cepas en matraces bajo las mismas condiciones descritas en la solicitud de patente 25, WO2009/144270.

Tabla 9: Titulaciones de metionina producidas por cepas de *C. glutamicum* D. E. F. G y H en comparación con la cepa de referencia C.

El símbolo indica que no hay diferencia entre las cepas, el símbolo + indica un incremento entre 1 y 3 %, el símbolo ++ indica un incremento mayor que 3%.

Cepa	Cepa C	Cepa F	Cepa D	Cepa E	Cepa G	Cepa H
Número de repeticiones	n = 10	n = 2	n = 2	n = 2	n = 2	n = 2
Titulación de metionina % comparado con la cepa	referencia		+		++	+

30 De manera similar a *E. coli*, en *C. glutamicum*, la combinación de la hiperexpresión de los genes *brnFE* y el sistema de metionina sintasa dependiente de cobalamina (de *E. coli* – cepa H y de *C. glutamicum* - cepa G) tiene un efecto sinérgico sobre la producción de metionina, lo que produce un inesperado aumento de la producción de metionina.

35 Ejemplo 7: Hiperproducción de metionina sintasa dependiente de cobalamina e hiperproducción de sistemas de secreción de L-metionina homólogos en una cepa de *E.coli* que hiperproduce L-metionina– Construcción de las cepas 8 a 17

Los genes homólogos de *ygaZH* de la especie *Citrobacter*, especie *Raoultella*, especie *Shigella*, especie *Enterobacter*, especie *Yersinia* y especie *Photorhabdus* se hiperexpresaron en la base genética de la cepa 5.

40 Antes de usar la cepa 5, se eliminó el cassette de antibiótico de la integración cromosómica en el locus *ytfA* usando la Flp recombinasa descrita por Datsenko & Wanner, 2000 (de acuerdo con el Protocolo 1). Se seleccionaron los transformantes sensibles a kanamicina y se verificó la ausencia de cassette de antibiótico en el locus *ytfA* por análisis PCR con oligonucleótidos apropiados. La cepa resultante se denominó cepa 8.

Construcción de la cepa 9 – Hiperproducción del sistema de secreción de L-metionina endógena de *ygaZH* de *E. coli*

Para comparar el efecto de la hiperexpresión de *ygaZH* de *E. coli* y la hiperexpresión de homólogos de *ygaZH* en la misma base genética, el plásmido pME1247 que porta *ygaZH* de *E. coli* se transformó en la cepa 8, dando origen a la cepa 9.

5 Construcción de las cepas 10 a 17 – Hiperproducción de sistemas de secreción de L-metionina homóloga, hiperexpresión de *ygaZH* del género y la especie que se mencionan en la tabla 10

10 Para expresar los genes homólogos de *ygaZH* enumerados en la tabla 10, cada par de genes se clonó en el plásmido de número de copias moderadas pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990) con el uso del promotor natural y el sitio de unión al ribosoma natural del gen de *E. coli ygaZ* como se describió previamente para los genes de *E. coli ygaZH*. Como se especifica en la tabla 11, los genes homólogos de *ygaZH* se ampliaron o bien a partir de ADN genómico de la correspondiente cepa o se sintetizaron químicamente, con o sin optimización del uso de codones para *E. coli* (como lo propone el servicio GeneArt® Gene Synthesis con el software GeneOptimizer® - Lifetechnologies). Los fragmentos de ADN ampliados que comprenden los genes homólogos de *ygaZH* se describen en la SEQ ID indicada en la Tabla 11. Los plásmidos resultantes se denominaron como se menciona en la Tabla 11. Finalmente, cada plásmido se transformó en la cepa 8, dando las cepas 10 a 17, como se menciona en la tabla 11.

15 Tabla 10: Proteínas homólogas de YgaZH

Organismo	ygaZ		ygaH	
	Número de acceso	Nombre	Número de acceso	Nombre
<i>Citrobacter koseri</i>	YP_001455539.1 NC_009792.1. ABV15103.1	proteína hipotética CKO_04031 [Citrobacter koseri ATCC BAA-895]	YP_001455540.1 ABV15104.1	proteína hipotética CKO_04032 [Citrobacter koseri ATCC BAA-895]
<i>Shigella flexneri</i>	WP_005122932.1 EIQ78635.1	proteína de membrana [Shigella flexneri]	WP_005122930.1 EIQ78634.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Shigella flexneri]
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	YP_007877063.1 AGJ89511.1 WP_015585890.1	proteína hipotética RORB6_24155 [Raoultella ornithinolytica B6]	YP_007877062.1 AGJ89510.1	exportador de L-valina [Raoultella ornithinolytica B6]
<i>Enterobacter sp.</i>	YP_008107733.1 AGN85393.1 WP_020454909.1	proteína de membrana [Enterobacter sp. R4-368]	YP_008107734.1 WP_020454910.1 AGN85394.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Enterobacter sp. R4-368]
<i>Yersinia enterocolitica subsp. Enterocolitica</i>	EKA28834.1 YWA314-01718	transportador de aminoácidos putativo [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica WA-314]	EKA28833.1 ou YWA314-01713	proteína hipotética YE3239 [Yersinia enterocolitica subsp. Enterocolitica WA-314]
<i>Photorhabdus luminescens subsp. Laumondii</i>	NP_928590.1 CAE13573.1	proteína hipotética plu1279 [Photorhabdus luminescens subsp. laumondii TTO1]	NP_928589.1 CAE13572.1	proteína hipotética plu1278 [Photorhabdus luminescens subsp. laumondii TTO1]
<i>Citrobacter youngae</i>	WP_006687199.1 EFE06904.1	proteína de membrana [Citrobacter youngae] proteína de resistencia a azaleucina putativa AzIC [Citrobacter youngae]	WP_006687198.1 EFE06903.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Citrobacter youngae]

Organismo	ygaZ		ygaH	
	Número de acceso	Nombre	Número de acceso	Nombre
		ATCC 29220]		
<i>Citrobacter freundii</i>	WP_003839672.1	proteína hipotética [Citrobacter freundii]	WP_003037297.1	permeasa transportadora ABC de aminoácidos de cadena ramificada [Citrobacter freundii]

Tabla 11: Plásmidos y cepas que portan genes homólogos de *ygaZH*

Microorganismo	Síntesis química	Optimización de uso de codones	SEQ ID N°	Nombre del plásmido	Nombre de la cepa
<i>Citrobacter koseri</i>	no	no	28	pME1277	Cepa 10
<i>Shigella flexneri</i>	sí	no	29	pME1274	Cepa 11
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	sí	sí	30	pME1275	Cepa 12
<i>Enterobacter sp.</i>	sí	sí	31	pME1283	Cepa 13
<i>Yersinia enterocolitica subsp. Enterocolitica</i>	no	no	32	pME1287	Cepa 14
<i>Photobacterium luminescens subsp. Laumondii</i>	no	no	33	pME1281	Cepa 15
<i>Citrobacter youngae</i>	sí	sí	34	pME1311	Cepa 16
<i>Citrobacter freundii</i>	sí	sí	35	pME1307	Cepa 17

Ejemplo 8: Producción de L-metionina por fermentación en experimentos en matraces

- 5 Se evaluaron productores de L-metionina recombinante que hiperproducen la metionina sintasa dependiente de cobalamina MetH además de distintos sistemas de secreción de L-metionina de diversos microorganismos (homólogos de *YgaZH* de *E.coli*) en matraces Erlenmeyer pequeños.

10 Las cepas de producción se evaluaron en matraces Erlenmeyer pequeños. Se desarrolló un precultivo de 5,5 ml a 30°C durante 21 horas en un medio mixto (10% medio LB (Sigma 25%) con 2,5 g.L⁻¹ glucosa y 90% medio mínimo PC1). Se usó para inocular un cultivo de 50 ml hasta un valor de OD₆₀₀ de 0,2 en el medio PC1. Se añadió espectinomicina en una concentración de 50 mg.L⁻¹ y gentamicina a 10 mg.L⁻¹ cuando fue necesario. La temperatura de los cultivos fue 37°C. Cuando el cultivo había alcanzado un valor OD₆₀₀ de 5 a 7, se cuantificaron los aminoácidos extracelulares por HPLC después de la derivación OPA/Fmoc y se analizaron otros metabolitos relevantes usando HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa) y GC-MS después de la sililación.

- 15 Tabla 12: Composición de medio mínimo (PC1)

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080
H ₃ BO ₃	0,0010
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0004
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00
Ácido cítrico	6,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04
K ₂ HPO ₄	8,00
Na ₂ HPO ₄	2,00
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8,00
NH ₄ Cl	0,13
NaOH 4M	Ajustado hasta pH 6,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,04
Tiamina	0,01
Glucosa	20,00
Tiosulfato de amonio	5,61
Vitamina B12	0,01
MOPS	20,00
IPTG	0,0048

Tabla13: Rendimiento de metionina (Y_{met}) en g de metionina/% g de glucosa producido en cultivo en matraces por las cepas de interés que hiperexpresan genes homólogos de *ygaZH* además de los genes *meth*, *fldA* y *fpr*. Para la definición precisa de rendimiento de metionina/glucosa, ver a continuación. "n" indica el número de repeticiones.

Cepa	Y _{met}
Cepa 8 (n=2)	16,0
Cepa 9 (<i>E.coli</i>) (n=10)	16,2
Cepa 10 (<i>C. koseri</i>) (n=4)	18,4

Cepa	Y _{met}
Cepa 11 (<i>S.flexneri</i>) (n=1)	16,6
Cepa 12 (<i>R. ornithinolytica</i>) (n=2)	16,2
Cepa 13 (<i>Enterobacter sp.</i>) (n=2)	18,8
Cepa 14 (<i>Y. enterocolitica subsp. Enterocolitica</i>) (n=2)	16,3
Cepa 15 (<i>P. luminescens subsp. Laumondii</i>) (n=2)	16,1
Cepa 16 (<i>C. youngae</i>) (n=2)	18,1
Cepa 17 (<i>C.freundii</i>) (n=2)	18,4

5 Como se puede observar en la tabla 13, la hiperexpresión de los genes homólogos de *ygaZH* de diversos microorganismos en los genes que hiperproduce L-metionina, *metH*, *fldA*, *fpr*, provoca desempeños equivalentes o mejores que aquellos obtenidos con la cepa 9 que hiperexpresa *ygaZH* de *E.coli*. Los sistemas de secreción de L-metionina homólogos de otros microorganismos que *E. coli* pueden reemplazar a las proteínas endógenas de la bacteria. Las proteínas homólogas de YgaZH de *Citrobacter Koseri* (cepa 10, Y_{met}=19,6g/g), *Citrobacter youngae* (cepa 16, Y_{met}=19,6g/g), *Citrobacter freundii* (cepa 17, Y_{met}=19,6g/g) y *Enterobacter sp.* (cepa 13, Y_{met}=19,4g/g) demostraron los mejores rendimientos de la producción de L-metionina comparadas con la cepa 9 (Y_{met}=18,7g/g).

El rendimiento de metionina se expresó de la siguiente manera:

$$10 \quad Y_{met} = \frac{\text{metionina (g)}}{\text{glucosa consumida (g)}} * 100$$

REFERENCIAS

- Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:120-128.
- Banerjee R.V., Harder S.R., Ragsdale S.W., Matthews R.G., 1990, Biochemistry, 29:1129-1135
- 5 • Carrier T., Keasling J.D., 1999, Biotechnology Progress, 15:58-64
- Datsenko K.A., Wanner B.L., 2000, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 97:6640-6645
- Drummond J.T., Jarrett J., González J.C., Huang S., Matthews R.G., 1995, Analytical Biochemistry, 228(2):323-329.
- 10 • Eikmanns B.J., Kleinertz E., Liebl W., Sahm H., 1991, Gene, 102:93-98
- Foster M.A., Jones K.M., Woods D.D., 1961, Biochemical Journal, 80:519-531
- Fujii K. and Huennekens F.M., 1974, Journal of Biological Chemistry, 249 (21):6745-6753
- Gonzalez J.C., Banerjee R.V., Huang S., Summer J.S., Matthews R.G., 1992, Biochemistry, 31:6045-6056
- Lerner C.G. and Inouye M., 1990, Nucleic Acids Research, 18(15):4631
- 15 • Liebl et al., 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205-210.
- Matthews R.G., 2001, Accounts of Chemical Research, 34:681-689
- Miller, 1992; "A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Riedel et al., 2001, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 573-583.
- 20 • Saunderson C.L., 1985, British Journal of Nutrition, 54:621-633
- Schaefer et al. 1999, Anal. Biochem. 270: 88-96.
- Trötschel C., Deutenberg D., Bathe B., Burkovski A., Krämer R., 2005, Journal of bacteriology. 187(11):3786-3794
- Wan J.T. y Jarrett J.T., 2002, Archives of Biochemistry and Biophysics, 406:116-126

LISTA DE SECUENCIAS

<110> EXPLORADOR METABÓLICO

<120> Microorganismo para producción de metionina con mejor actividad de metionina sintasa y flujo de metionina

5 <130> 366226D32914

<150> EP13306185.3

<151> 2013-08-30

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1

<211> 245

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Glu Ser Pro Thr Pro Gln Pro Ala Pro Gly Ser Ala Thr Phe Met
1 5 10 15

Glu Gly Cys Lys Asp Ser Leu Pro Ile Val Ile Ser Tyr Ile Pro Val
20 25 30

Ala Phe Ala Phe Gly Leu Asn Ala Thr Arg Leu Gly Phe Ser Pro Leu
35 40 45

Glu Ser Val Phe Phe Ser Cys Ile Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gln Phe
50 55 60

Val Ile Thr Ala Met Leu Ala Ala Gly Ser Ser Leu Trp Ile Ala Ala
65 70 75 80

Leu Thr Val Met Ala Met Asp Val Arg His Val Leu Tyr Gly Pro Ser
85 90 95

Leu Arg Ser Arg Ile Ile Gln Arg Leu Gln Lys Ser Lys Thr Ala Leu
100 105 110

Trp Ala Phe Gly Leu Thr Asp Glu Val Phe Ala Ala Ala Thr Ala Lys
115 120 125

Leu Val Arg Asn Asn Arg Arg Trp Ser Glu Asn Trp Met Ile Gly Ile
130 135 140

15 Ala Phe Ser Ser Trp Ser Ser Trp Val Phe Gly Thr Val Ile Gly Ala
145 150 155 160

ES 2 693 789 T3

Phe Ser Gly Ser Gly Leu Leu Gln Gly Tyr Pro Ala Val Glu Ala Ala
 165 170 175

Leu Gly Phe Met Leu Pro Ala Leu Phe Met Ser Phe Leu Leu Ala Ser
 180 185 190

Phe Gln Arg Lys Gln Ser Leu Cys Val Thr Ala Ala Leu Val Gly Ala
 195 200 205

Leu Ala Gly Val Thr Leu Phe Ser Ile Pro Val Ala Ile Leu Ala Gly
 210 215 220

Ile Val Cys Gly Cys Leu Thr Ala Leu Ile Gln Ala Phe Trp Gln Gly
 225 230 235 240

Ala Pro Asp Glu Leu
 245

<210> 2

< 211> 111

< 212> PRT

5 < 213> Escherichia coli

<400> 2

Met Ser Tyr Glu Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Val Gly Val Ala Asn
 1 5 10 15

Tyr Cys Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Arg Leu Arg Val Gly Asn Ala Arg
 20 25 30

Pro Thr Lys Arg Gly Ala Val Gly Ile Leu Leu Asp Thr Ile Gly Ile
 35 40 45

Ala Ser Ile Cys Ala Leu Leu Val Val Ser Thr Ala Pro Glu Val Met
 50 55 60

His Asp Thr Arg Arg Phe Val Pro Thr Leu Val Gly Phe Ala Val Leu
 65 70 75 80

Gly Ala Ser Phe Tyr Lys Thr Arg Ser Ile Ile Ile Pro Thr Leu Leu
 85 90 95

Ser Ala Leu Ala Tyr Gly Leu Ala Trp Lys Val Met Ala Ile Ile
 100 105 110

<210> 3

< 211> 244

10 < 212> PRT

< 213> Citrobacter koseri

<400> 3

ES 2 693 789 T3

Met Glu Ser Pro Ala Pro Gln Ser Glu Pro Arg Pro Ala Thr Leu Thr
1 5 10 15

Glu Gly Phe Lys Asp Ser Leu Pro Ile Val Ile Ser Tyr Ile Pro Val
20 25 30

Ala Phe Ala Phe Gly Leu Asn Ala Thr Arg Leu Gly Phe Thr Pro Leu
35 40 45

Glu Ser Val Phe Phe Ser Cys Ile Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gln Phe
50 55 60

Val Ile Thr Thr Met Leu Ala Ala Gly Ser Thr Leu Trp Val Ala Ala
65 70 75 80

Leu Thr Val Met Ala Met Asp Val Arg His Val Leu Tyr Gly Pro Ser
85 90 95

Leu Arg Ser Arg Ile Ser Gln Arg Leu Ser Lys Pro Lys Thr Ala Leu
100 105 110

Trp Ala Phe Gly Leu Thr Asp Glu Val Phe Ala Ala Ala Thr Ala Lys
115 120 125

Leu Val Arg Asp Asn Arg Arg Trp Ser Glu Trp Met Ile Gly Ile Ala
130 135 140

Phe Cys Ser Trp Ala Ser Trp Val Leu Gly Thr Val Ile Gly Ala Phe
145 150 155 160

Ser Gly Ser Gly Leu Leu Lys Gly Phe Pro Ala Val Glu Ala Ala Leu
165 170 175

Gly Phe Met Leu Pro Ala Leu Phe Met Ser Phe Leu Leu Ala Ser Phe
180 185 190

Gln Arg Lys Gln Thr Leu Cys Val Thr Ala Ala Leu Ile Gly Ala Leu
195 200 205

Ala Gly Val Thr Leu Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ile Leu Ala Gly Ile
210 215 220

Ala Ser Gly Cys Leu Thr Ala Leu Ile Gln Ser Phe Trp Gln Gly Ala
225 230 235 240

Pro Asp Glu Leu

<210> 4

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Citrobacter koseri

<400> 4

ES 2 693 789 T3

Met Ser Tyr Glu Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Val Gly Cys Ala Asn
 1 5 10 15

Tyr Cys Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Arg Leu Arg Met Gly Asn Thr Arg
 20 25 30

Pro Ala Arg Arg Gly Ala Thr Gly Val Leu Leu Asp Thr Ile Gly Ile
 35 40 45

Ala Ser Ile Cys Ala Leu Leu Val Val Ser Thr Ala Pro Glu Val Met
 50 55 60

His Asp Ala Ser Arg Phe Ile Pro Thr Leu Val Gly Phe Ala Val Leu
 65 70 75 80

Gly Val Ser Phe Tyr Lys Thr Arg Ser Ile Ile Ile Pro Thr Leu Leu
 85 90 95

Ser Ala Leu Gly Tyr Gly Leu Ala Trp Lys Ile Glu Val Ile Leu
 100 105 110

<210> 5

< 211> 245

< 212> PRT

5 < 213> Shigella flexneri

<400> 5

Met Glu Ser Pro Val Pro Gln Ser Glu Ser Arg Ser Ala Thr Leu Thr
 1 5 10 15

Glu Gly Phe Lys Asp Ser Leu Pro Ile Val Ile Ser Tyr Ile Pro Val
 20 25 30

Ala Phe Ala Phe Gly Met Asn Ala Thr Arg Leu Gly Phe Thr Pro Val
 35 40 45

Glu Ser Val Phe Phe Ser Cys Ile Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gln Phe
 50 55 60

Val Ile Thr Thr Met Leu Ala Ala Gly Ser Ser Leu Trp Val Ala Ala

ES 2 693 789 T3

Met Ser Tyr Glu Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Val Gly Cys Val Asn
 1 5 10 15

Tyr Cys Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Arg Leu Arg Met Gly Asn Val Arg
 20 25 30

Pro Thr Lys Arg Gly Ala Thr Gly Ile Leu Leu Asp Thr Ile Gly Ile
 35 40 45

Ala Ser Ile Cys Ala Leu Leu Val Val Ser Thr Ala Pro Glu Val Met
 50 55 60

His Asp Ala Arg Arg Phe Val Pro Thr Leu Val Gly Phe Val Val Leu
 65 70 75 80

Gly Ala Ser Phe Tyr Lys Thr Arg Ser Ile Ile Ile Pro Thr Leu Leu
 85 90 95

Ser Ala Leu Gly Tyr Gly Leu Ala Trp Lys Met Leu Phe Val Leu
 100 105 110

<210> 7

5 < 211> 242

< 212> PRT

< 213> Raoutella ornithinolytica

<400> 7

ES 2 693 789 T3

Met Glu Lys Pro Ala Pro Ala Ser Glu Ala Thr Leu Pro Glu Gly Ile
 1 5 10 15

Lys Asp Ser Leu Pro Ile Val Ile Ser Tyr Ile Pro Val Ala Phe Ala
 20 25 30

Phe Gly Leu Asn Ala Thr Arg Leu Gly Phe Thr Pro Leu Glu Ser Leu
 35 40 45

Phe Phe Ser Cys Ile Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gln Phe Val Ile Thr
 50 55 60

Ala Met Leu Ala Ala Gly Ser Ser Leu Trp Val Ala Ala Leu Thr Val
 65 70 75 80

Met Ala Met Asp Val Arg His Val Leu Tyr Gly Pro Ser Leu Arg Ser
 85 90 95

Arg Ile His Arg Ala Leu Asp Lys Arg Lys Thr Ala Leu Trp Ala Phe
 100 105 110

Gly Leu Thr Asp Glu Val Phe Ala Ala Ala Thr Ala Lys Leu Val Arg
 115 120 125

Asp Asn Arg Arg Trp Ser Glu Ser Trp Met Leu Gly Ile Ala Phe Thr
 130 135 140

Ser Trp Ile Ser Trp Val Phe Gly Thr Leu Ile Gly Ala Tyr Ser Gly
 145 150 155 160

Ser Gly Leu Leu Val Gly Phe Pro Ala Val Glu Ala Ala Leu Ser Phe
 165 170 175

Met Leu Pro Ala Leu Phe Met Ser Phe Leu Leu Ala Ser Phe Gln Arg
 180 185 190

Lys Gln Ser Leu Ser Val Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Leu Gly Gly
 195 200 205

Ile Ile Leu Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ile Leu Ala Gly Ile Val Cys
 210 215 220

Gly Cys Leu Ala Ala Leu Ile Gln Ala Ser Ile Gln Gly Met Pro Asp
 225 230 235 240

Glu Gln

<210> 8

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Raoultella ornithinolytica

<400> 8

ES 2 693 789 T3

Met Asn Asn Asn Val Leu Ile Ile Gly Ile Val Val Gly Cys Val Asn
 1 5 10 15

Tyr Leu Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Arg Leu Arg Ala Gly Asn Ala Arg
 20 25 30

Pro Thr Arg Arg Gly Pro Leu Ser Val Leu Leu Asp Thr Ile Gly Ile
 35 40 45

Ala Ser Ile Cys Ala Leu Leu Ile Val Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu
 50 55 60

Ser Asp Ser Arg Arg Leu Leu Pro Thr Leu Val Gly Phe Thr Val Leu
 65 70 75 80

Gly Leu Ala Phe Trp Lys Thr Arg Ser Ile Ile Met Pro Thr Leu Leu
 85 90 95

Ser Ala Leu Ala Tyr Gly Ile Ala Trp Lys Ile Thr Thr Phe Leu Tyr
 100 105 110

Phe

<210> 9

< 211> 250

< 212> PRT

5 < 213> Enterobacter sp.

<400> 9

ES 2 693 789 T3

Met Asp Met Asp Ser Ser Val Thr Ala Thr Lys Ser Thr Ser Asp Gln
 1 5 10 15

Ser Ala Thr Phe Leu Glu Gly Ile Lys Asp Ser Leu Pro Ile Val Leu
 20 25 30

Ser Tyr Val Pro Val Ala Phe Ala Phe Gly Met Asn Ala Thr Lys Leu
 35 40 45

Gly Phe Thr Pro Leu Glu Ser Val Phe Phe Ser Cys Ile Ile Tyr Ala
 50 55 60

Gly Ala Ser Gln Phe Val Ile Thr Thr Met Leu Ala Ala Gly Ser Ala
 65 70 75 80

Leu Trp Val Ala Ala Leu Thr Val Met Ala Met Asp Val Arg His Val
 85 90 95

Leu Tyr Gly Pro Ser Leu Arg Ser Arg Ile Leu Gln Pro Leu Lys Asn
 100 105 110

Arg Lys Thr Ala Val Trp Ala Phe Gly Leu Thr Asp Glu Val Phe Ala
 115 120 125

Ala Ala Thr Ala Lys Leu Val Arg Asp Asn Arg Arg Trp Ser Glu Asn
 130 135 140

Trp Met Ile Gly Ile Ala Leu Phe Ser Trp Leu Ser Trp Val Ala Gly
 145 150 155 160

Thr Val Leu Gly Ala Phe Ser Gly Asp Gly Leu Leu Asp Gly Tyr Pro
 165 170 175

Ala Val Glu Ser Ala Leu Gly Phe Met Leu Pro Ala Leu Phe Met Ser
 180 185 190

Phe Leu Leu Ala Ser Phe Gln Arg Arg Gln Ile Ser Ala Val Thr Ala
 195 200 205

Ala Leu Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Thr Leu Phe Ser Ile Pro Ala
 210 215 220

Ala Ile Leu Ala Gly Ile Phe Ala Gly Cys Leu Ala Ala Leu Val Gln
 225 230 235 240

Ala Phe Tyr Gln Gly Ala Ser Asp Ala Gln
 245 250

<210> 10

< 211> 111

5 < 212> PRT

< 213> Enterobacter sp.

ES 2 693 789 T3

<400> 10

Met Arg Asn Glu Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Val Gly Cys Val Asn
1 5 10 15

Phe Leu Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Arg Ile Arg Ala Gly Gln Ser Arg
20 25 30

Pro Ala Lys Arg Gly Val Ser Gly Val Phe Leu Asp Thr Ile Gly Ile
35 40 45

Ala Ser Ile Cys Ala Leu Leu Val Val Ser Cys Val Pro Glu Ile Ala
50 55 60

Ala Asp Ser Arg Arg Leu Leu Pro Thr Leu Ala Gly Phe Ala Val Leu
65 70 75 80

Gly Val Ser Phe Trp Lys Thr Arg Ser Ile Ile Leu Pro Thr Leu Leu
85 90 95

Ser Ala Phe Ala Tyr Gly Ile Val Trp Lys Leu Leu Ala Asp Ala
100 105 110

<210> 11

< 211> 257

5 < 212> PRT

< 213> *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica*

<400> 11

ES 2 693 789 T3

Met Gln Ser Gln Thr Thr Asp Ser Pro Ser Thr Ala Gln Pro Thr Ala
1 5 10 15

Thr Phe Ile Glu Gly Ile Thr Asp Ser Leu Pro Ile Val Ile Gly Tyr
20 25 30

Leu Pro Val Ala Phe Ala Phe Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Gly Phe
35 40 45
Thr Pro Trp Glu Ala Ile Phe Phe Ser Cys Ile Ile Tyr Ala Gly Ala
50 55 60

Ser Gln Phe Val Ile Thr Ala Leu Leu Ser Ala Gly Met Ser Leu Trp
65 70 75 80

Val Ser Ala Leu Thr Val Met Ala Met Asp Val Arg His Ile Leu Tyr
85 90 95

Gly Pro Ala Leu Lys His Arg Ile Val Thr Arg Leu Ser Gly Lys Lys
100 105 110

Thr Ala Leu Trp Ala Phe Gly Leu Thr Asp Glu Val Phe Ala Ala Ala
115 120 125

Thr Thr Lys Leu Met Lys Asp Gln Arg Arg Trp Ser Glu Asn Trp Met
130 135 140

Leu Gly Ile Ala Phe Thr Ser Trp Leu Ser Trp Val Ala Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ile Gly Ala Met Phe Gly His Gly Pro Leu Glu Asn Tyr Pro Ala Ile
165 170 175

Glu Ala Ser Leu Ser Phe Met Leu Pro Ala Leu Phe Leu Ser Phe Leu
180 185 190

Leu Ala Ser Phe Lys Arg Gln Tyr Ser Leu Thr Val Ile Ala Ser Leu
195 200 205

Thr Gly Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Phe Ser Ile Pro Val Ala Ile
210 215 220

Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Cys Leu Ala Ala Leu Leu Gln Pro Val
225 230 235 240

Pro Glu Thr Val Ile Glu Asn Asn Glu Ser Asp Lys Glu Glu Pro Lys
245 250 255

Pro

<210> 12

<211> 257

5 <212> PRT

<213> Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica

ES 2 693 789 T3

<400> 12

Met Gln Ser Gln Thr Thr Asp Ser Pro Ser Thr Ala Gln Pro Thr Ala
 1 5 10 15

Thr Phe Ile Glu Gly Ile Thr Asp Ser Leu Pro Ile Val Ile Gly Tyr
 20 25 30

Leu Pro Val Ala Phe Ala Phe Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Gly Phe
 35 40 45

Thr Pro Trp Glu Ala Ile Phe Phe Ser Cys Ile Ile Tyr Ala Gly Ala
 50 55 60

Ser Gln Phe Val Ile Thr Ala Leu Leu Ser Ala Gly Met Ser Leu Trp
 65 70 75 80

Val Ser Ala Leu Thr Val Met Ala Met Asp Val Arg His Ile Leu Tyr
 85 90 95

Gly Pro Ala Leu Lys His Arg Ile Val Thr Arg Leu Ser Gly Lys Lys
 100 105 110

Thr Ala Leu Trp Ala Phe Gly Leu Thr Asp Glu Val Phe Ala Ala Ala
 115 120 125

Thr Thr Lys Leu Met Lys Asp Gln Arg Arg Trp Ser Glu Asn Trp Met
 130 135 140

Leu Gly Ile Ala Phe Thr Ser Trp Leu Ser Trp Val Ala Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ile Gly Ala Met Phe Gly His Gly Pro Leu Glu Asn Tyr Pro Ala Ile
 165 170 175

Glu Ala Ser Leu Ser Phe Met Leu Pro Ala Leu Phe Leu Ser Phe Leu
 180 185 190

Leu Ala Ser Phe Lys Arg Gln Tyr Ser Leu Thr Val Ile Ala Ser Leu
 195 200 205

Thr Gly Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Phe Ser Ile Pro Val Ala Ile
 210 215 220

Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Cys Leu Ala Ala Leu Leu Gln Pro Val
 225 230 235 240

Pro Glu Thr Val Ile Glu Asn Asn Glu Ser Asp Lys Glu Glu Pro Lys
 245 250 255

Pro

<210> 13

5 <211> 113

ES 2 693 789 T3

< 212> PRT

< 213> Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica

<400> 13

Met Asn Met Asp Val Val Ile Ile Gly Leu Val Val Gly Thr Val Asn
1 5 10 15

Tyr Leu Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Arg Leu Gly Pro Ala Arg Lys Gln
20 25 30

Ala Gly Leu Gln Arg Gly Lys Val Ser Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly
35 40 45

Ile Ala Ser Ile Cys Ala Leu Leu Val Val Ser Ser Thr Pro Glu Ile
50 55 60

Val His Thr Pro Gln Lys Leu Ile Pro Thr Leu Ile Gly Phe Leu Val
65 70 75 80

Ile Cys Gly Cys Phe Tyr Lys Thr Asn Ser Ile Ile Phe Ala Thr Leu
85 90 95

Leu Gly Ala Leu Ser Tyr Gly Leu Thr Phe Lys Leu Leu Met Ile Leu
100 105 110

Ala

5 <210> 14

< 211> 113

< 212> PRT

< 213> Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica

<400> 14

ES 2 693 789 T3

Met Asn Met Asp Val Val Ile Ile Gly Leu Val Val Gly Thr Val Asn
 1 5 10 15

Tyr Leu Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Arg Leu Gly Pro Ala Arg Lys Gln
 20 25 30

Ala Gly Leu Gln Arg Gly Lys Val Ser Leu Leu Leu Asp Ser Ile Gly
 35 40 45

Ile Ala Ser Ile Cys Ala Leu Leu Val Val Ser Ser Thr Pro Glu Ile
 50 55 60

Val His Asn Pro Gln Lys Leu Ile Pro Thr Leu Ile Gly Phe Leu Val
 65 70 75 80

Ile Cys Gly Cys Phe Tyr Lys Thr Asn Ser Ile Ile Phe Ala Thr Leu
 85 90 95

Leu Gly Ala Leu Ser Tyr Gly Leu Thr Phe Lys Leu Leu Met Ile Leu
 100 105 110

Ala

<210> 15

5 < 211> 252

< 212> PRT

< 213> Photorhabdus luminescens subsp. laumondii

<400> 15

ES 2 693 789 T3

Met Pro Val Ser Asp Thr Ser Ser Pro Leu Thr Ser Lys Lys Ser Ser
 1 5 10 15

Phe Thr Glu Gly Ile Ile Asp Ser Leu Pro Ile Val Ile Gly Tyr Ile
 20 25 30

Pro Val Ala Phe Ala Phe Gly Leu Asn Ala Val Lys Leu Gly Phe Asn
 35 40 45

Pro Met Glu Ala Ile Phe Phe Ser Cys Ile Ile Tyr Ala Gly Ala Ser
 50 55 60

Gln Phe Val Ile Thr Ala Leu Leu Ser Ala Gly Thr Ser Leu Trp Ile
 65 70 75 80

Ser Ala Leu Thr Ile Met Ala Met Asp Val Arg His Ile Leu Tyr Gly
 85 90 95

Pro Ser Leu Arg His Arg Ile Lys Asp Lys Leu Thr Glu Lys Lys Thr
 100 105 110

Val Ile Trp Ala Phe Gly Leu Thr Asp Glu Val Phe Ala Ala Ala Thr
 115 120 125

Ala Lys Leu Ile Lys Asn His Arg Ser Trp Ser Glu Asn Trp Met Val
 130 135 140

Ala Ile Ala Ile Cys Ser Trp Leu Ala Trp Gly Ala Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Gly Ala Phe Leu Gly Asn Gly Tyr Leu Glu Ser Tyr Pro Ala Ile Glu
 165 170 175

Ala Ala Met Ile Phe Met Leu Pro Ala Leu Phe Leu Ser Phe Leu Leu
 180 185 190

Ala Ser Cys Arg Lys Gln Asn Ser Tyr Cys Val Ala Thr Ala Leu Thr
 195 200 205

Gly Ala Leu Leu Gly Ile Thr Phe Phe Ser Ile Pro Val Ala Ile Leu
 210 215 220

Ala Gly Ile Val Gly Gly Cys Ile Ala Ala Leu Leu Gln Pro Gln Asn
 225 230 235 240

Asn Cys Asn Asp Ser Ser Glu Gln Lys Glu Thr Pro
 245 250

<210> 16

5 <211> 112

<212> PRT

<213> *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii*

<400> 16

ES 2 693 789 T3

Met Ile Asp Ser Lys Ile Leu Leu Ile Gly Leu Phe Val Gly Leu Ala
1 5 10 15

Asn Phe Ser Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Arg Phe Gly Lys Ala Arg Gln
20 25 30

Ser Ala Gly Arg Lys Ala Gly Lys Thr Ser Ile Ile Leu Asp Ser Ile
35 40 45

Gly Ile Ala Ser Ile Cys Ser Leu Leu Ile Val Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Val Met Arg Glu Ser Gln Lys Leu Leu Pro Thr Leu Ile Gly Cys Leu
65 70 75 80

Thr Ile Cys Leu Val Phe Tyr Lys Thr Lys Gln Ile Ile Leu Ala Thr
85 90 95

Leu Phe Gly Ala Leu Leu Phe Gly Leu Thr Phe Lys Ile Phe Met Asn
100 105 110

<210> 17

< 211> 245

< 212> PRT

5 < 213> Citrobacter youngae

<400> 17

ES 2 693 789 T3

Met Asp Ser Pro Ile Pro Gln Ser Gly Ser Arg Ser Ala Thr Leu Thr
1 5 10 15

Glu Gly Phe Lys Asp Ser Leu Pro Ile Val Ile Ser Tyr Ile Pro Val
20 25 30

Ala Phe Ala Phe Gly Leu Asn Ala Thr Arg Leu Gly Phe Thr Pro Val
35 40 45

Glu Ser Val Phe Leu Ser Cys Ile Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gln Phe
50 55 60

Val Ile Thr Thr Met Leu Ala Ala Gly Ser Ser Leu Trp Val Ala Ala
65 70 75 80

Leu Thr Val Met Ala Met Asp Val Arg His Val Leu Tyr Gly Pro Ser
85 90 95

Leu Arg Ser Arg Ile Ala Gln Arg Leu Ser Lys Pro Lys Ser Ala Leu
100 105 110

Trp Ala Phe Gly Leu Thr Asp Glu Val Phe Ala Ala Ala Thr Ala Lys
115 120 125

Leu Val Arg Asp Asn Arg Arg Trp Ser Glu Asn Trp Met Ile Gly Ile
130 135 140

Ala Leu Cys Ser Trp Ala Ser Trp Val Phe Gly Thr Ala Ile Gly Ala
145 150 155 160

Phe Ser Gly Ser Gly Leu Leu Lys Asp Tyr Pro Ala Val Glu Ala Ala
165 170 175

Leu Gly Phe Met Leu Pro Ala Leu Phe Met Ser Phe Leu Leu Ala Ser
180 185 190

Phe Gln Arg Lys Gln Ala Leu Cys Val Thr Val Ala Leu Thr Gly Ala
195 200 205

Leu Ala Gly Val Ile Leu Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ile Leu Leu Gly
210 215 220

Ile Val Cys Gly Cys Leu Thr Ala Leu Leu Gln Ser Phe Trp Gln Gly
225 230 235 240

Gly Pro Asp Glu Leu
245

<210> 18

5 <211> 111

<212> PRT

<213> Citrobacter youngae

<400> 18

ES 2 693 789 T3

Met Ser Tyr Glu Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Val Gly Cys Val Asn
 1 5 10 15

Tyr Cys Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Arg Leu Gly Ala Gly Asn Val Arg
 20 25 30

Pro Ala Arg Arg Gly Ala Thr Gly Ile Leu Leu Asp Thr Ile Gly Ile
 35 40 45

Ala Ser Ile Cys Ala Leu Leu Val Val Ser Thr Ala Pro Glu Val Met
 50 55 60

His Asp Ala Arg Arg Phe Val Pro Thr Leu Val Gly Phe Val Ile Leu
 65 70 75 80

Gly Ala Ser Phe Tyr Lys Thr Arg Ser Ile Ile Ile Pro Thr Leu Leu
 85 90 95

Ser Ala Leu Gly Tyr Gly Leu Ala Trp Lys Met Leu Val Gly Leu
 100 105 110

<210> 19

< 211> 245

< 212> PRT

5 < 213> Citrobacter freundii

<400> 19

Met Glu Ser Pro Val Pro Gln Ser Glu Ser Ser Ser Ala Thr Leu Thr
 1 5 10 15

Glu Gly Phe Lys Asp Ser Leu Pro Ile Val Ile Ser Tyr Ile Pro Val
 20 25 30

Ala Phe Ala Phe Gly Leu Asn Ala Thr Arg Leu Gly Phe Thr Pro Val
 35 40 45

ES 2 693 789 T3

Glu Ser Val Phe Phe Ser Cys Ile Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gln Phe
50 55 60

Val Ile Thr Thr Met Leu Ala Ala Gly Ser Ser Leu Trp Val Ala Ala
65 70 75 80

Leu Thr Val Met Ala Met Asp Val Arg His Val Leu Tyr Gly Pro Ser
85 90 95

Leu Arg Ser Arg Ile Ala Gln Arg Leu Ser Lys Pro Lys Ser Ala Leu
100 105 110

Trp Ala Phe Gly Leu Thr Asp Glu Val Phe Ala Ala Ala Thr Ala Lys
115 120 125

Leu Val Arg Asp Asn Arg Arg Trp Ser Glu Asn Trp Met Ile Gly Ile
130 135 140

Ala Leu Cys Ser Trp Ala Ser Trp Val Phe Gly Thr Val Leu Gly Ala
145 150 155 160

Phe Ser Gly Ser Gly Leu Leu Lys Asp Tyr Pro Ala Val Glu Ala Ala
165 170 175

Leu Gly Phe Met Leu Pro Ala Leu Phe Met Ser Phe Leu Leu Ala Ser
180 185 190

Phe Gln Arg Lys Gln Ala Leu Cys Val Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala
195 200 205

Leu Ala Gly Val Met Leu Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ile Leu Ala Gly
210 215 220

Ile Val Cys Gly Cys Leu Thr Ala Leu Ile Gln Ser Phe Trp Gln Gly
225 230 235 240

Gly Pro Asp Glu Leu
245

<210> 20

< 211> 111

< 212> PRT

5 < 213> Citrobacter freundii

<400> 20

ES 2 693 789 T3

Met Ser Tyr Glu Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Val Gly Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Tyr Cys Phe Arg Tyr Leu Pro Leu Arg Leu Gly Val Gly Asn Val Arg
 20 25 30

Pro Thr Lys Arg Gly Ala Thr Gly Ile Leu Leu Asp Thr Ile Gly Ile
 35 40 45

Thr Ser Ile Cys Ala Leu Leu Val Val Ser Thr Ala Pro Glu Val Met
 50 55 60

His Asp Ala Arg Arg Phe Val Pro Thr Leu Val Gly Phe Val Ile Leu
 65 70 75 80

Gly Ala Ser Phe Tyr Lys Thr Arg Ser Ile Ile Ile Pro Thr Leu Leu
 85 90 95

Ser Ala Leu Gly Tyr Gly Leu Ala Trp Lys Met Leu Val Val Leu
 100 105 110

<210> 21

< 211> 100

5 < 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Oligonucleótido

<400> 21

aacactgcaa aatcctgcta tttgatttgt atgagtgata agtgtaacgc cgaataatcg 60

10 tcggtggcga attttacgac tctgacagga ggtggcaatg 100

<210> 22

< 211> 100

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

15 <220>

< 223> Oligonucleótido

<400> 22

gagaaagtaa acgtaacatg atgacgacaa ttctgacgat tcatgttcct tcaacgccgg 60

ggcgcgcatg gaatatgctg gtggcacttc aggcaggaaa 100

<210> 23

20 < 211> 100

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Oligonucleótido

25 <400> 23

ES 2 693 789 T3

tgaggaatag acaatgtag ttagtaaaag caacggattt aacgctagcg cagttttggg 60
 tagtggaagt tataatgaaa ataatcttc taaacacatg 100
 <210> 24
 5 < 211> 100
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Oligonucleótido
 10 <400> 24
 tgcgctaaaa gaaatgaata gaaccttttc gataatataa gaaaaagtga ttttcatggt 60
 ggtttactta agccaagtag tacgcgtagt gttatttttag 100
 <210> 25
 < 211> 45
 < 212> ADN
 15 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Oligonucleótido
 <400> 25
 aaattattct tgtatcttg ttataatag ggaaagtgca accat 45
 20 <210> 26
 < 211> 100
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 25 < 223> Oligonucleótido
 <400> 26
 cgттаатсag caggтtagcc agccacaaaa agccattgag aaaattattg attttсatg 60
 ggattattat attgctaатc cttggttttt aaaaattgtg 100
 <210> 27
 < 211> 100
 30 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Oligonucleótido
 <400> 27
 tсatctaccg cgcacgaata aaactgccat cgggctggcg ggtgaacagg acctgtgat 60
 35 tattccccgt atcaatggtt aagcccgтca ccacgcogct 100
 <210> 28

ES 2 693 789 T3

< 211> 1063

< 212> ADN

< 213> *Citrobacter koseri*

<400> 28

```

atggaagcc ctgcaccca gtctgagccc cgtccggcaa cattaacgga aggattcaaa      60
gacagtttac cgatagtcac aagttatatt cgggtggcgt ttgcgtttgg ccttaacgcc      120
accgctctgg gctttactcc cctcgaaagc gtttttttct cctgcattat ttacgcaggc      180
gccagccagt tcgtcatcac caccatgctc gcggcgggca gcacattatg ggtcgccggc      240
ctgaccgtga tggcgatgga cgtgcgctcat gtgctgtacg gcccttcctt gcgtagtcgc      300
atcagccaac ggctcagtaa acctaaaacc gccctgtggg catttggcct caccgatgaa      360
gtgtttgctg ccgccacggc caaactggtg cgggataacc gccgctggag tgaaaactgg      420
atgatcggca tcgcgttctg ctctggggcc tcctgggtgc tcggcacggc cattggcgca      480
ttttccggga gcggattgct gaaaggcttc cccgccgttg agggggcatt aggttttatg      540
ctgccagccc tgtttatgag ctttttgctc gcttcttttc aacgcaaaca aacgctgtgc      600
gtcacggcgg cgttaatcgg cgcgctggca ggcgtcacgc tgttttccat tcctgcggct      660
atcctggcgg gtatcgccag cgggtgtctg accgccttga tccagtcggt ctggcaagga      720
gcgcccgatg agttatgagg ttctgctgct gggactgctg gtcggctgcg ccaattattg      780
ttttcgttat ttaccgcttc gtctgcgaat gggaaacacc cgcccccca ggcgcggcgc      840
aacggcgtg ttgctcgaca ccattggcat cgcgtccatc tgcgccctgc tgggtgtgtc      900
tacggctccc gaagtgatgc acgacgccag ccggttcatt ccgacgctgg tcgggtttgc      960
cgtcctgggc gtcagtttct acaagacgcg cagcatcatc atcccaacgc tactgagcgc     1020
5 tctgggctat ggactcgcct ggaagataga ggtcatttta taa                               1063

```

<210> 29

< 211> 1063

< 212> ADN

< 213> *Shigella flexneri*

10 <400> 29

ES 2 693 789 T3

atggaaagcc ctgttcccca gtctgaatcc cgttctgcaa cgtaaactga aggattcaaa 60
gacagcctac cgatagttat cagttatatt ccggtcgcac ttgcatttgg tatgaatgcg 120
actcgcctgg gctttactcc cgttgaaagc gtttttttct cctgcatcat ttacgctggc 180
gccagccagt ttgtcatcac aaccatgctc gccgcaggca gctcactgtg ggtcgcggct 240
ctgaccgtca tggcgatgga tgttcgccat gttttgtacg gcccttctct gcgcagccgt 300
atcgcccgac agctgagcaa acctaaaagc gcgctatggg cctttggcct caccgacgaa 360
gtctttgccg cggcaacggc caagctggtg cgggataacc ggcgctggag tgaaaactgg 420
atgatcggca tcgcgctatg ctctctggct tcctgggtac ttggtagcgt tatcggcgca 480
ttttccggca ctggcttact gaagggattc ccggcggtag aagcggcgct ggggtttatg 540
ctcccggcgc tgtttatgag ttttctgctg gcctctttcc agcgtaatca aacgctatgc 600
gtcacggcgg ctttagccgg tgcgctggct ggcgtgacgc tgttttctat cccggcagcc 660
atcctcgcag gcatagtctg cggatgcctg accgcgctca ttcagtcggt ctggcagggg 720
ggtcctgatg agttatgagg ttctgctgct cggcctgctg gtccgctgcg tcaattactg 780
ttttcgctat ttaccactgc gtctgcgaat ggggaatgtg cgcccgacaa aacgcggagc 840
cactggaata ctactcgaca ccatcggtat tgcacaaatt tgcgccctgc tagtggtgtc 900
tactgcgcca gaagtgatgc acgatgcccc tcgttttgtg cctacgctgg tggggtttgt 960
ggtaactgggt gcaagcttct ataagaccgc cagcatcctc attccgacct tactgagtgc 1020
cctgggctat ggattagcct ggaaaatgct gtttgtctta tag 1063

<210> 30

5 < 211> 1060

< 212> ADN

< 213> Raoultella ornithinolytica

<400> 30

ES 2 693 789 T3

atggaaaaac cggcaccggc aagcgaagca accctgccgg aaggtattaa agatagcctg 60
 ccgattgtga ttagctatat tccggttgca tttgcctttg gtctgaatgc aaccctctcg 120
 ggttttacac cgctggaaag cctgtttttt agctgtatta tctatgccgg tgcaagccag 180
 tttgttatta ccgcaatgct ggcagcaggt agcagcctgt gggttcagc actgaccggt 240
 atggcaatgg atgttcgtca tgttctgtat ggtccgagcc tgcgtagccg tattcatcgt 300
 gcactggata aacgtaaaac cgcactgtgg gcatttggcc tgaccgatga agtttttgca 360
 gcagcaaccg caaaactggt tcgtgataat cgtcgttggg gcgaaagctg gatgctgggt 420
 attgcattta ccagctggat tagctgggtt tttggcacc ccgattgggtc atatagcgggt 480
 agcggctctgc tggttgggtt tccggcagtt gaagcagccc tgagctttat gctgcctgca 540
 ctgtttatga gttttctgct ggcaagcttt cagcgtaaac agagcctgag cgttaccgca 600
 gcactggcag gcgcaactgg tggtattatt ctgtttagca tccggcagc aattctggca 660
 ggtattgttt gtggttgtct ggcagcgtcg attcaggcaa gcattcaggg tatgccggat 720
 gaacaataac gttctgatta ttggtattgt ggtgggctgt gtgaattacc tgtttcgtta 780
 tctgccgctg cgtctgcgtg caggaatgc acgtccgacc cgtcgtggtc cgctgagcgt 840
 tctgctggat accattggca ttgcaagcat ttgtgcactg ctgattgtta gcagcgttcc 900
 ggaaattctg agcgatagcc gtcgtctgct gccgaccctg gttggtttta ccgttctggg 960
 tctggcattt tggaaaacc gtagcattat tatgccgaca ctgctgagcg cactggccta 1020
 tggattgca tggaaaatta ccaccttct gtatttttga 1060

<210> 31

< 211> 1078

< 212> ADN

5 < 213> Enterobacter sp.

<400> 31

ES 2 693 789 T3

atggatatgg atagcagcgt taccgcaacc aaaagcacca gcgatcagag cgcaaccttt 60
ctggaaggta ttaaagatag cctgccgatt gttctgagct atgttccggt tgcatttgcc 120
tttggtatga atgcaaccaa actgggtttt acaccgctgg aaagcgtgtt ttttagctgt 180
attatctatg ccggtgcaag ccagtttggt attaccacca tgctggcagc aggtagcgca 240
ctgtgggttg cagcaactgac cgttatggca atggatgttc gtcatgttct gtatggcccg 300
agcctgcgta gccgtattct gcagccgctg aaaaatcgta aaaccgcagt gtgggcattt 360
ggctctgaccg atgaagtttt tgcagcagca accgcaaaac tggttcgtga taatcgtcgt 420
tggagcgaaa attggatgat tggattgca ctgtttagct ggctgagctg ggttgccggt 480
acagttctgg gtgcatttag cggatgatgg ctgctggatg gttatccggc agttgaaagt 540
gcactgggct ttatgctgcc tgccctgttt atgagctttc tgctggcaag ctttcagcgt 600
cgtcagatta gcgcagttac cgcagcactg ctgggtgcac tggcaggcgt taccctgttt 660
agcattccgg cagcaattct ggcaggcatt tttgcaggtt gtctggcagc actggttcag 720
gccttttatc agggtgcaag tgatgcgcaa tgaggttctg ctgctgggcc tgctggttg 780
ttgtgtaaat tttctgtttc gttatctgcc gctgcgtatt cgtgcaggtc agagccgtcc 840
ggcaaaacgt ggtgtagcgt gtgtttttct ggataccatt ggcattgcaa gcatttgtgc 900
cctgctggta gttagctgtg ttccggaaat tgcagcagat agccgtcgtc tgctgccgac 960
cctggcagggt tttgcagtgc tgggtgttag cttttggaaa acccgtagca ttattctgcc 1020
gacactgctg agcgcatttg cgtatggtat tgtttggaaa ctgctggcag atgcctaa 1078

<210> 32

< 211> 1112

< 212> ADN

5 < 213> *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica*

<400> 32

ES 2 693 789 T3

atgcaaagcc aaaccaccga ctccccctcg acggcccagc cgaccgccac ctttattgaa 60
 ggaataaccg atagcctacc gattgttatc ggttatctac ccggttgcttt tgcctttggg 120
 ttgagttcgg taaaacttgg ctttactccg tgggaagcta ttttcttttc ttgcattatt 180
 tatgccggag ccagccaatt cgttattacc gccctgctca gcgcggggat gtcattgtgg 240
 gtttccgcct tgaccgtgat ggctatggat gtccgccata tcttgtacgg gccagcactg 300
 aaacaccgca ttgtaaccag gttatctggc aaaaaaacgg cgctgtgggc ctttggctct 360
 actgatgaag tgtttgccgc cgcaacaacc aagctaataa aagatcaacg gcgctggagt 420
 gaaaactgga tgcttgccat cgcggtcacc tcttggttgt cttgggtagc tggcaccgct 480
 atcggcgcga tgtttggtca tgggccgctg gaaaattacc cggcgattga agcatcactc 540
 tcctttatgc tcccggcgct attcctcagc ttcttattgg cctcgttcaa acgccaatac 600
 agccttaccg ttattgcttc actgaccgga gccttgctgg gcgtgctgct gttctctatt 660
 ccggtggcta ttttagccgg tattggcggc ggatgcctgg cagccctgct ccaaccgctc 720
 cccgagaccg ttatagaaaa taacgagagt gataaagagg agccgaagcc atgaatatgg 780
 atgttgatgat cattggtttg gtggtgggaa cggcaatta cctgtttctg tatctgccgc 840
 tgcgcctggg gcctgcccgt aaacaagcag gcctgcaacg agggaaagtc tccctgttgc 900
 tagacagcat cgggatcgcc tctatctgtg cgttgttggg ggtttccagt accccggaga 960
 tagtgcataa cccacagaaa ttaattccta cactaattgg ttttttagtt atctgtggat 1020
 gcttttataa aaccaacagt attatcttcg ccaccttact gggagcactc agttacggtc 1080
 tgacattcaa attactgatg attttggcat aa 1112

<210> 33

5 < 211> 1094

< 212> ADN

< 213> Photorhabdus luminescens

<400> 33

ES 2 693 789 T3

atgcctgttt ctgatacatc atccccctta acgagtaaaa aatcttcttt tactgaagga	60
ataatagata gtttaccatc tggtatcggg tatattcccg tcgcctttgc ttttggcttc	120
aatgccgtca aacttggcct caacccaatg gaagccattt tcttttcacg catcatctac	180
gccggtgcaa gccagttcgt catcacagct ttactgagtg cggggacatc attatggatt	240
tctgccctaa caattatggc aatggatgtc cgccatattc tttatgggcc atctttaagg	300
caccgtatca aagataagct aacggagaaa aaaaccgcta tctgggcttt cggcctgaca	360
gatgaagttt ttgccgccgc gactgcaaaa ctcatataaa accaccggag ctggagtgaa	420
aactggatgg ttgctattgc aatctgttct tggctggcct ggggcgcagc taccgcagcc	480
ggtgcatttc ttggtaacgg ttatttggaa tcctatcccg ctatagaagc tgccatgatt	540
ttcatgttac cagcaactatt tctcagtttt cttcttgctt cttgtagaaa acaaaatagt	600
tattgtgttg caaccgcact aaccggagca cttttaggga ttacattttt ctcaattcca	660
gttgctattc tggcaggtat tgcctgggtg tgtatcggcg cactgttaca accgcaaac	720
aattgcaatg actcttcaga acaaaaggaa acaccatgat tgatagcaag attttgcgta	780
ttggactatt tgttgggtta gctaactttt catttcgcta tctgccacta cgatttggga	840
aagcacgcca atctgccgcg agaaaagctg gaaaaacaag cattatcctt gacagtattg	900
gtattgcac ctttgttct ttactcatcg tatcaggtgt acctgatgtg atgagagaaa	960
gtcaaaaact acttcctacc ctcataggtt gtctgaccat ctgtttagtc ttttcaaaa	1020
caaagcaaat tatactcgca acaactattg gcgcactgct ttttggacta acattcaaaa	1080
tatttatgaa ttag	1094

<210> 34

5 < 211> 1063

< 212> ADN

< 213> Citrobacter youngae

<400> 34

ES 2 693 789 T3

atggatagcc cgattccgca gagcggtagc cgtagcgcga ccctgaccga aggttttaaa 60
gatagcctgc cgattgtgat tagctatatt ccggttgcac ttgcctttgg tctgaatgca 120
accctgtctgg gttttacacc ggttgaaagc gtttttctga gctgtattat ctatgccggc 180
gcaagccagt ttgttattac caccatgctg gcagcaggta gcagcctgtg ggttgcagca 240
ctgaccgcta tggcaatgga tgttcgtcat gttctgtatg gtccgagcct gcgtagccgt 300
attgcacagc gtctgagcaa accgaaaagc gcactgtggg catttggcct gaccgatgaa 360
gtttttgcag cagcaaccgc aaaactgggt cgtgataatc gtcgttggag cgaaaattgg 420
atgattggta ttgcaactgt tagctgggca agctgggttt ttggcaccgc aattggtgca 480
tttagcggta gcggtctgct gaaagattat ccggcagttg aagcagcact gggctttatg 540
ctgcctgcac tgtttatgag ctttctgctg gcgagctttc agcgtaaaca ggcactgtgt 600
gttaccgttg cctgaccgg tgcactggca ggcgttattc tgtttagcat tccggcagca 660
attctgctgg gtattgtttg tggttgtctg accgcactgc tgcagagctt ttggcagggc 720
ggctccgatg agctatgagg ttctgctgct gggctctgctg gttggttgtg tgaattattg 780
ttttcgttat ctgccgctgc gtctgggtgc aggtaatggt cgtccggcac gtcgtggtgc 840
aaccggtatc ctgctggata caattggcat tgcaagcatt tgtgcaactgc tggtagttag 900
caccgcaccg gaagttatgc atgatgcacg tcgttttggc ccgaccctgg tgggttttgt 960
tattctgggt gccagcttct ataaaaccgc tagcattatt atcccgacc tgctgagcgc 1020
actgggttat ggtctggcat ggaaaatgct ggtaggtctg taa 1063

<210> 35

< 211> 1063

< 212> ADN

5 < 213> Citrobacter freundii

<400> 35

ES 2 693 789 T3

atggaaagtc	cggttccgca	gagcgaagc	agcagcgcaa	ccctgaccga	aggttttaa	60
gatagcctgc	cgattgtgat	tagctatatt	ccggttgc	ttgcctttgg	tctgaatgca	120
acccgtctgg	gttttacacc	ggttgaaagc	gtgtttttta	gctgcattat	ctatgccggt	180
gcaagccagt	ttgttattac	caccatgctg	gcagcaggta	gcagcctgtg	ggttgcaagca	240
ctgaccgtta	tggcaatgga	tgttcgcat	gttctgtatg	gtccgagcct	gcgtagccgt	300
attgcacagc	gtctgagcaa	accgaaaagc	gcactgtggg	catttggcct	gaccgatgaa	360
gtttttgcag	cagcaaccgc	aaaactgggt	cgtgataatc	gtcgttgagg	cgaaaattgg	420
atgattggta	ttgcaactgtg	tagctgggca	agctgggttt	ttggcaccgt	tctgggtgca	480
tttagcggta	gcggtctgct	gaaagattat	ccggcagttg	aagcagcact	gggctttatg	540
ctgcctgcac	tgtttatgag	ctttctgctg	gcgagctttc	agcgtaaaca	ggcactgtgt	600
gttaccgcag	ccctggcagg	cgcactggct	ggtgttatgc	tgtttagcat	tccggcagca	660
attctggcag	gtattgtttg	tggttgtctg	accgcactga	ttcagagcct	ttggcaggg	720
ggcccgatg	agctatgaag	ttctgctgct	gggtctgctg	gttggttgtg	tgaattattg	780
ttttcgttat	ctgccgctgc	gtctgggtgt	tggtaatggt	cgtccgacca	aacgtggtgc	840
aaccgtatt	ctgctggata	ccattggtat	taccagcatt	tgtgactgc	tggtagttag	900
caccgcaccg	gaagttatgc	atgatgcacg	tcgttttggt	ccgaccctgg	tgggttttgt	960
tatcctgggt	gccagcttct	ataaaaccgc	tagcattatt	atcccgacc	tgctgagcgc	1020
actgggttat	ggtctggcat	ggaaaatgct	ggttgtctg	taa		1063

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo recombinante genéticamente modificado para presentar una producción fermentativa mejorada de metionina y/o sus derivados en comparación con la producción endógena de los correspondientes microorganismos de tipo salvaje, en donde en dicho microorganismo recombinante, la expresión de *metH* de *E. coli*, y la expresión de los genes *fldA* y *fpr* de *E. coli* se potencian y los genes *ygaZH* de *E. coli* o sus genes homólogos se hiperexpresan, en donde dicho microorganismo recombinante es *Escherichia coli* y en donde la expresión potenciada y la hiperexpresión, respectivamente, se logran
- 5 - aumentando el número de copias del gen en el microorganismo,
- 10 - usando un promotor que produce un alto nivel de expresión del gen,
- atenuando la actividad o la expresión de un represor de transcripción, específico o no específico del gen, o
- utilizando elementos que estabilizan el correspondiente ARN mensajero o elementos que estabilizan la proteína.
2. El microorganismo recombinante según la reivindicación 1, en donde dichos genes *metH*, *fldA* y *fpr* se hiperexpresan a nivel cromosómico.
- 15 3. El microorganismo recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dichos genes homólogos *ygaZH* se seleccionan del grupo que consiste en genes homólogos de la especie *Citrobacter*, especie *Shigella*, especie *Raoultella*, especie *Enterobacter*, especie *Yersinia* y especie *Photobacter*.
4. El microorganismo recombinante según la reivindicación 3, en donde los genes homólogos de *ygaZH* se originan de *Citrobacter koseri*, *Shigella flexneri*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Photobacter luminescens*, *Citrobacter youngae* o *Citrobacter freundii*.
- 20 5. El microorganismo recombinante según las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho *ygaZH* o genes homólogos se expresan bajo el control de un promotor inducible.
6. El microorganismo recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la expresión de por lo menos uno de los siguientes genes también aumenta: *ptsG*, *pyc*, *pntAB*, *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *metF*, *metA*, alelo de *metA* * que codifica una enzima con sensibilidad de retroalimentación reducida a S-adenosilmetionina y/o metionina, *thrA* o un alelo de *thrA* * que codifica una enzima con inhibición de retroalimentación reducida a treonina.
7. El microorganismo recombinante según la reivindicación 6, en donde por lo menos uno de dichos genes está bajo el control de un promotor inducible.
- 30 8. El microorganismo recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la expresión de por lo menos uno de los siguientes genes también se atenúa: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *ybdL*, *yncA*, *metE*, *dgsA*, *metN*, *metI*, *metQ* o *udhA*.
9. El microorganismo recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde:
- a. dichos genes *metH*, y *fldA* y *fpr* se hiperexpresan,
- 35 b. dichos genes *ygaZ* y *ygaH* o los genes *brnF* y *brnE* o sus genes homólogos que se originan de *Citrobacter koseri*, *Shigella flexneri*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Photobacter luminescens*, *Citrobacter youngae* o *Citrobacter freundii* se hiperexpresan,
- c. la expresión de los genes *metA* *, *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP*, *metF*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *thrA* *, *ptsG* y *pyc* se potencia; y
- 40 d. la expresión de los genes *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *dgsA*, *metE* y *yncA* se atenúa.
10. Un método para la producción fermentativa de metionina y/o sus derivados, que comprende las etapas de:
- a. cultivar un microorganismo recombinante según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en un medio de cultivo adecuado que comprende una fuente fermentable de carbono y una fuente de azufre, y
- b. recuperar metionina y/o sus derivados del medio de cultivo.