

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 466**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2009 PCT/EP2009/060811**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO10020681**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2009 E 09782063 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2326724**

54 Título: **Producción de metionina sin N-acil-metionina**

30 Prioridad:

**22.08.2008 WO PCT/EP2008/061005
12.02.2009 US 370422**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BESTEL-CORRE, GWÉNAËLLE;
SOUCAILLE, PHILIPPE y
FIGGE, RAINER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 739 466 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

Producción de metionina sin N-acil-metionina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para la producción de metionina o sus derivados cultivando un microorganismo en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y una fuente de azufre. El microorganismo y/o el medio de cultivo y/o los parámetros de proceso se modificaron de tal forma que se redujo la acumulación del subproducto N-acil-metionina (NAM). También se reivindica el aislamiento de metionina o sus derivados del medio de fermentación.

Estado de la técnica

10 Los compuestos que contienen azufre tales como cisteína, homocisteína, metionina o S-adenosilmetionina son críticos para el metabolismo celular y se producen industrialmente para ser usados como aditivos alimentarios o para piensos y productos farmacéuticos. En particular, la metionina, un aminoácido esencial, que no se puede sintetizar por los animales, desempeña una función importante en muchas funciones del cuerpo. Actualmente se produce D,L-metionina por síntesis química a partir de acroleína, metilmercaptano y cianuro de hidrógeno. El aumento de los
15 precios de los precursores derivados de petróleo acroleína y metilmercaptano, acoplado al aumento de la demanda de metionina, convierte en atractiva la producción microbiana de metionina.

Se conoce bien la vía para la síntesis de L-metionina en muchos microorganismos (revisado en Figge RM (2006), ed Wendisch VF, Microbiol Monogr (5) Amino acid biosynthesis p164-185). Se han descrito cepas productoras de metionina de *E. coli* y *C. glutamicum* en las solicitudes de patente WO2005/111202, WO2007/077041,
20 WO2007/012078 y WO2007/135188.

La metionina producida por fermentación se necesita purificar del caldo de fermentación. La rentable purificación de la metionina se basa en cepas productoras y procesos de producción que minimizan la cantidad de subproductos en el caldo de fermentación. Los "subproductos" se originan a partir de vías de transformación y/o degradación de metionina. En particular, estos productos son S-adenosil-metionina (SAM), tio-metil-ribosa y las N-acil-metioninas
25 (NAM) tales como N-acetil-metionina y N-propionil-metionina. Como se muestra en la solicitud de patente PCT/EP2007/060433, las cepas productoras de metionina de *E. coli* producen N-acetil-metionina. *E. coli* también produce N-propionil-metionina.

La producción de NAM no es deseable, puesto que reduce el rendimiento de metionina y dificulta más la purificación de metionina. NAM se puede transformar en metionina y acetato mediante la adición de NAM acilasas al final de la serie de fermentación, pero esto aumenta drásticamente el coste del producto. Por tanto, es necesario reducir o
30 eliminar la acumulación de NAM durante la serie de fermentación. Esto requiere un buen entendimiento de las reacciones, que son responsables de la acumulación de NAM.

La acetilación del extremo N de metionina como proceso co-traducciona es una de las modificaciones de proteína más comunes en eucariotas. Sin embargo, es poco probable que la N-acetil-metionina se produzca por acetilasas del extremo N (para una revisión véase Plevoda & Sherman 2000 JBC 275, 47, pp 36479-36482), puesto que parece que la metionina se acetila como un aminoácido libre en bacterias productoras de metionina y la acetilación de metionina como proceso co-traducciona es raro en procariotas (Driessen et al. 1985, CRC Crit. Rev. Biochem. 18, 281-325). La N-acetil-metionina se obtiene lo más probablemente acetilando L-metionina libre. Se han descrito
35 enzimas N-acetilantes, que posiblemente podrían acetilar metionina. Por ejemplo, ArgA codifica una N-acetil-glutamato sintasa en *E. coli* (Marvil & Leisinger 1977 JBC 252, 10 pp. 3295-3303).

Hasta ahora eran desconocidas las enzimas capaces de catalizar la producción biosintética de N-acetil-metionina, N-propionil-metionina u otros derivados de metionina con cadenas de acilo más largas. La identificación de las principales actividades de metionina-N-acil transferasa y su atenuación en microorganismos productores de metionina es así crucial para la reducción de la producción de NAM.

45 La acumulación de NAM también se puede reducir desacetilando las NAM acumuladas para obtener metionina. Se ha demostrado la desacetilación de grupos N-acilo a partir de aminoácidos en bacterias. Por ejemplo, ArgE que codifica N-acetilornitina desacetilasa tiene un amplio espectro de sustrato y desacetila eficientemente N-acetilmetionina (Javid-Majd & Blanchard 2000 Biochemistry 39, 1285-93). Así, la expresión en exceso de *argE* u otras aminoácido desacetilasas, tales como acilasa I de riñón de rata (Giardina et al 2000 Eur. J. Biochem. 267, 6249-55), aminoácido acilasa de *Aspergillus niger* o riñón de cerdo (Gentzen et al. 1980 Z. Naturforsch 35 c, 544-50) puede reducir la acumulación de NAM.

Puesto que NAM se exporta al espacio extracelular, la exportación de NAM acilasas en el periplasma o espacio extracelular puede ser una ventaja. Se conocen sistemas de exportación en *E. coli* que permiten la exportación en el periplasma, por ejemplo sistemas TAT y Sec (revisado en Manting & Driessen 2000 Mol Microbiol 37, 226-38, Choi & Lee 2004 Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 625-635). La exportación por la vía TAT o Sec requiere la presencia de
55 péptidos señal específicos. Si se favorece la exportación en el espacio extracelular, la proteína de interés se pueden

fusionar a proteínas transportadoras que normalmente son exportadas dentro del medio, tales como OmpF o hemolisina (Choi & Lee 2004 Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 625-635). La proteína también puede ser exportada dentro del medio o presentada sobre la superficie celular fusionándola a dominios de proteína que se requieren para la exportación de proteínas autotransportadoras, tales como IgA1 de *N. gonorrhoeae* o AIDA-I de *E. coli*. Las proteínas también se pueden exportar por la vía de dos componentes o presentación en fagos (Jacob-Dubuisson et al. 2004 Biochim et Biophys Act 1694 235-257, José & Meyer 2007 Microbiol and Molecul Biol Rev 71, 600-19). También se ha mostrado que el diseño de proceso impacta sobre la exportación de ciertas proteínas (Shokri et al 2003 Appl Microbiol Biotechnol 60, 654-64).

Breve descripción de la invención

10 Los solicitantes han resuelto el problema de reducir la acumulación del subproducto N-acil-metionina (NAM) en cepas productoras de metionina.

Los inventores han identificado la principal actividad de metionina N-aciltransferasa (MNAT), que cataliza la conversión de metionina en NAM, para ser codificada por el gen *yncA* en *E. coli*.

15 Se desvela en el presente documento un microorganismo modificado que presenta una atenuación de la expresión del gen *yncA* y, por tanto, una producción reducida de NAM.

Los inventores también mostraron que la expresión en exceso de enzimas desacilantes, tales como aminoácido acilasa de *Aspergillus oryzae* o aminoácido acilasa de riñón de cerdo, que convierten NAM en metionina, conducen a una disminución de la cantidad de NAM. Preferencialmente, dichas enzimas desacilantes son exportadas dentro del periplasma o dentro del espacio extracelular.

20 En otro aspecto, las condiciones de cultivo se adaptaron para obtener una reducción de la producción y/o acumulación de NAM.

Estos tres medios para reducir la acumulación de NAM se aplicaron individualmente o en combinación, para reducir la acumulación de NAM.

25 Se usa glucosa como sustrato modelo y *E. coli* recombinante como organismo modelo, pero la invención no se limita a estas características.

Por consiguiente, la presente divulgación se relaciona con un microorganismo en el que se ha atenuado la expresión de la principal MNAT (metionina N-acil-transferasa) que codifica genes, preferencialmente se han deletado los genes correspondientes, y/o se han expresado en exceso enzimas desacilantes NAM homólogas o heterólogas, para reducir la acumulación de NAM.

30 Este microorganismo con producción y/o acumulación reducida de NAM muestra un rendimiento mejorado de producción de metionina / fuente de carbono.

Descripción detallada de la invención

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

- 35
- cultivar un microorganismo modificado en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno, y
 - recuperar la metionina y/o sus derivados del medio de cultivo,

en donde en comparación con un microorganismo o método no modificado, el microorganismo o el método se ha modificado para reducir la acumulación del subproducto N-acil metionina por una de las siguientes modificaciones:

- 40
- la atenuación de la expresión de al menos una metionina N-acil transferasa (es decir, transacilasas), y/o
 - la expresión o potenciamiento de la expresión de al menos una amino acilasa específica de metionina; y/o
 - la variación de condiciones de cultivo añadiendo una N-acil aminoácido acilasa (NAM acilasa) al medio de cultivo.

45 En un aspecto particular de la invención, la N-acil metionina cuya acumulación se reduce se elige entre el siguiente grupo: N-acetil-metionina, N-propionil-metionina, N-butilil-metionina, y sus combinaciones.

Según la invención, los términos "cultivo", "fermentación" o "proceso fermentativo" se usan indistintamente para indicar el crecimiento de bacterias sobre un medio de crecimiento apropiado que contiene una simple fuente de carbono.

Un "medio de cultivo apropiado" es un medio apropiado para el cultivo y crecimiento del microorganismo. Dichos medios se conocen bien en la técnica de la fermentación de microorganismos, que dependen del microorganismo a cultivar.

5 La expresión "recuperación de metionina y/o sus derivados del medio de cultivo" designa la acción de recuperar metionina, y posiblemente SAM y NAM y todos los otros derivados que puedan ser útiles.

10 El término "microorganismo" designa una bacteria, levadura u hongo. Preferencialmente, el microorganismo se selecciona entre *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae* y *Corynebacteriaceae*. Más preferencialmente, el microorganismo es una especie de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Salmonella* o *Corynebacterium*. Incluso más preferencialmente, el microorganismo es cualquiera de las especies *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum*.

15 El término "microorganismo modificado" indica un microorganismo que se ha modificado genéticamente con el objetivo de reducir la acumulación de NAM en el caldo de fermentación. El experto en la técnica conoce cómo modular la expresión de genes específicos. Las modificaciones usuales incluyen transformar microorganismos con elementos genéticos, que incluyen delecciones de genes, sustituciones de genes, modificación de promotores e introducción de vectores para la expresión de genes heterólogos.

Los inventores han mostrado que NAM se forma por acilación de metionina y han identificado el gen *yncA* como la principal enzima productora de NAM. *yncA*, también conocido como el gen b1448 de *E. coli*, se ha mencionado en la solicitud de patente WO2001070776. Es parte de un grupo de genes inducidos por el regulador Mar, implicado en multirresistencia a fármaco.

20 Las enzimas aminoácido acilasa (EC 3.5.1.14), también denominadas desacetilasas, catalizan la escisión hidrolítica de un aminoácido de acilo para producir el aminoácido libre y el ácido carbónico correspondientes al resto de acilo. Más específicamente, las N-acil metionina acilasas catalizan la reacción de NAM con metionina y el ciclo de carboxiácido correspondiente.

25 El término "N-acil-metionina" designa N-formil-metionina, N-acetil-metionina, N-propionil-metionina, N-butilil-metionina y, en general, cualquier derivado de metionina que comprenda un grupo funcional derivado de cualquier ácido carboxílico que carece de la función hidroxilo.

Para medir la acumulación de N-acetil-metionina, la cantidad de N-acetil-metionina se determina en el caldo de fermentación usando HPLC refractométrica usando N-acetil-metionina (Sigma, Ref 01310) como patrón. La N-propionil-metionina se determina en el caldo de fermentación por CG-EM usando N-acetil-metionina como patrón.

30 La acumulación de NAM se debe reducir al menos 20 %, preferencialmente 50 %, más preferencialmente 80 % e incluso más preferencialmente 95 % de la cantidad acumulada en un proceso con el organismo no modificado en el proceso no modificado.

35 El término 'fuente de carbono', según la presente invención, indica cualquier fuente de carbono que se pueda usar por los expertos en la técnica para soportar el crecimiento normal de un microorganismo, que puede ser hexosas (tales como glucosa, galactosa o lactosa), pentosas, monosacáridos, disacáridos (tales como sacarosa, celobiosa o maltosa), oligosacáridos, melaza, almidón o sus derivados, hemicelulosas, glicerol y sus combinaciones. Una fuente de carbono especialmente preferida es la glucosa. Otra fuente de carbono preferida es la sacarosa. En una realización particular de la invención, la fuente de carbono se obtiene de materia prima renovable. La materia prima renovable se define como material de partida requerido para ciertos procesos industriales que se pueden regenerar dentro de un breve retraso y en cantidad suficiente para permitir su transformación en el producto deseado.

El término fuente de nitrógeno corresponde a ya sea una sal de amonio o gas de amoniaco. La fuente de nitrógeno se suministra en forma de amonio o amoniaco.

45 La fuente azufre usada para la producción fermentativa de L-metionina, sus precursores o sus compuestos derivados, puede ser cualquiera de las siguientes: sulfato, tiosulfato, sulfuro de hidrógeno, ditionato, ditionito, sulfito, metilmercaptano, disulfuro de dimetilo o una combinación de los mismos.

En una realización preferida de la invención, la fuente de azufre es sulfato y/o tiosulfato.

La fermentación se realiza generalmente en fermentadores con un medio de cultivo apropiado adaptado al microorganismo que se usa, que contiene al menos una simple fuente de carbono y, si fuera necesario, co-sustratos para la producción de metabolitos.

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

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

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

En una realización específica de la invención, la producción de N-acil-metionina se reduce atenuando al menos una de las metionina transacilasas. Las metionina transacilasas también se denominan metionina N-aciltransferasa (MNAT). *argA* codifica una enzima con supuesta actividad de metionina transacetilasa. Los inventores han purificado actividad de MNAT a partir de una cepa de *E. coli* con una delección de *argA*, secuenciado la proteína purificada y mostrado que la proteína purificada, YncA, tiene actividad de MNAT (solicitud de patente PCT/EP2008/060999). La atenuación de la expresión del gen *yncA* elimina una gran cantidad de la actividad residual de MNAT, que conduce a una espectacular reducción de la producción de NAM, especialmente de compuestos N-acetil-metionina y N-propionil-metionina. En una realización preferida de la invención, YncA se deleciona completamente del genoma de *E. coli*.

Se han identificado otras N-aciltransferasas con una actividad más baja, que permiten obtener una producción de NAM reducida cuando se atenúan; estas enzimas están codificadas por los siguientes genes: *yjdJ*, *yfaP*, *yedL*, *yjhQ*. Cualquiera de las metionina N-acil-transferasas descritas se puede atenuar individualmente o en combinación con las otras.

Los términos "atenuación de un gen" o "atenuación de la expresión de un gen" según la invención indican la supresión parcial o completa de la expresión de un gen, que entonces se dice que está 'atenuado'. Esta supresión de expresión puede ser o bien una inhibición de la expresión del gen, una inserción en o una delección de toda o parte de la región promotora necesaria para la expresión génica, una delección o inserción en la región codificante del gen, o el intercambio del promotor no mutante por un promotor natural o sintético más débil. Preferencialmente, la atenuación de un gen es esencialmente la delección completa de ese gen, que se puede sustituir por un gen marcador de selección que facilita la identificación, aislamiento y purificación de las cepas según la invención. Un gen se inactiva preferencialmente por la técnica de recombinación homóloga (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645).

También se desvela que la acumulación de N-acil-metionina se puede reducir expresando en el microorganismo enzimas amino acilasas específicas de metionina nativa o heteróloga, tales como:

- N-acilaminoácido acilasa de *Aspergillus*
- N-acilaminoácido acilasa de *cerdo*
- *argE* de *E. coli* que codifica acetilornitina desacetilasa, que actúa también sobre N-acetilmetionina.

La elevada expresión de amino acilasas específicas de metionina aumenta la velocidad de conversión de NAM en metionina con la producción concomitante de una molécula del carboxiácido correspondiente, tal como acetato, propionato o butirato. También es parte de la invención el favorecer el consumo de acetato expresando en exceso los genes *acs*, *pta-ackA* o genes que codifican la desviación del glioxilato.

Los términos "potenciado" o "expresado en exceso" en este contexto describen el aumento en la actividad intracelular de una actividad enzimática que está codificada por el ADN correspondiente, por ejemplo aumentando el número de copias del gen, usando un promotor más fuerte o usando un alelo con elevada actividad y posiblemente combinando estas medidas.

Los términos "elevada expresión", "potenciada expresión" o "expresión en exceso" se usan indistintamente en el texto y tienen significado similar.

Para aumentar la expresión de un gen se puede codificar cromosómica o extracromosómicamente. Cromosómicamente, puede haber una o varias copias en el genoma que se pueden introducir por métodos de recombinación conocidos para el experto en el campo. Extracromosómicamente, los genes pueden ser llevados por diferentes tipos de plásmidos que se diferencian con respecto a su origen de replicación y así sus número de copias en la célula. Pueden estar presentes como 1-5 copias, aproximadamente 20 o hasta 500 copias, correspondientes a plásmidos de bajo número de copias con estrecha replicación (pSC101, RK2), plásmidos de bajo número de copias (pACYC, pRSF1010) o plásmidos de alto número de copias (pSKbluescript II).

El gen se puede expresar usando promotores con diferente intensidad, que pueden ser inducibles. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos. El experto en la técnica conoce qué promotores son los más convenientes, por ejemplo, se usan ampliamente los promotores *P_{trc}*, *P_{tac}*, *P_{lac}* o el promotor *lambda cl*.

5 La expresión de las enzimas se puede reforzar o reducir por elementos que estabilizan o que desestabilizan el ARN mensajero correspondiente (Carrier and Keasling (1998) *Biotechnol. Prog.* 15, 58-64) o las proteínas (por ejemplo, marcas de GST, Amersham Biosciences).

10 Se conocen bien en la técnica todas las técnicas para transformar los microorganismos, y elementos reguladores usados para potenciar la producción de la proteína de la invención, y están disponibles en la bibliografía, que incluyen las solicitudes de patente del propio solicitante sobre la modificación de las vías de biosíntesis en diversos microorganismos, que incluyen WO2008/052973, WO2008/052595, WO2008/040387, WO2007/144346, WO2007/141316, WO2007/077041, WO2007/017710, WO2006/082254, WO2006/082252, WO2005/111202, WO2005/073364, WO2005/047498 y WO2004/076659. Las enzimas N-acil-metionina acilasa se expresarán en el espacio intracelular y pueden permanecer en el espacio intracelular o ser exportadas al periplasma o ser exportadas al espacio extracelular. El experto en el campo será capaz de identificar medios para dirigir la proteína al periplasma. 15 La exportación también se puede basar en fusionar las N-acetil-metionina acilasas a proteínas como OmpF, por presentación en fagos o usando sistemas de exportación de proteínas tales como la vía de dos componentes o autotransporte. En una realización preferida de la invención, se exportan enzimas NAM acilasa al periplasma o el compartimento extracelular para evitar el ciclado en vano entre NAM y metionina.

20 En otra realización de la presente invención, los inventores han adaptado los parámetros del proceso de fermentación, es decir, las condiciones de cultivo, para reducir la producción de NAM. Esto se lleva a cabo añadiendo al medio de cultivo una acilasa específica de NAM.

En una realización, el cambio de los parámetros de fermentación no incluye la privación del microorganismo de un sustrato inorgánico tal como fosfato, potasio, magnesio.

25 Estos tres medios para modular la acumulación de NAM se pueden usar solos o combinados con uno o dos de los otros medios.

30 Por consiguiente, la atenuación de la actividad de MNAT se obtiene atenuando la expresión de los siguientes genes: *yncA* y/o *argA* y/o, *yjdJ*, *yfaP*, *yedL*, *yjhQ*, codificando estos genes enzimas con metionina-N-aciltransferasas. Esta atenuación se pueden combinar con el aumento de la expresión de las enzimas N-acil-metionina desacilasa, tales como N-aminoácido acilasa de *Aspergillus*, N-aminoácido acilasa de cerdo o acetilornitina desacetilasa codificada por el gen *argE*.

Similarmente, la atenuación de al menos una enzima MNAT, como se ha descrito anteriormente, se puede combinar con la adición de NAM acilasa al caldo de fermentación, que permiten juntos una reducción de la acumulación de NAM.

35 Similarmente, la expresión de las enzimas NAM acilasa se puede combinar con la adaptación del proceso añadiendo NAM acilasa al caldo de fermentación. Se han descrito anteriormente los detalles de ambos medios.

Finalmente, se pueden combinar los tres medios: la atenuación de la actividad de MNAT, el aumento de la expresión de las enzimas NAM acilasa y la adaptación de las condiciones de proceso añadiendo NAM acilasa al caldo de fermentación.

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

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

50 Se obtienen COGs (racimos de grupos ortólogos de proteínas; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) comparando secuencias de proteínas de genomas completamente secuenciados que representan líneas filogénicas importantes. Cada COG se define a partir de al menos tres líneas, que permite la identificación de los primeros dominios conservados.

Los expertos en la técnica conocen bien los medios para identificar secuencias homólogas y su porcentaje de homologías, e incluyen en particular los programas BLAST, que se pueden usar del sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros por defecto indicados en ese sitio web. Entonces se pueden explotar (por ejemplo, alinear) las secuencias obtenidas usando, por ejemplo, los programas CLUSTALW

(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) o MULTALIN (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>), con los parámetros por defecto indicados en los sitios web.

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

10 La presente divulgación también está relacionada con un microorganismo tal como se ha descrito anteriormente. Un microorganismo con una acumulación y/o producción reducida de N-acil metionina es en particular útil para producir metionina con alto rendimiento. Preferencialmente, el microorganismo ya es un gran productor de metionina antes de ser usado en el proceso según la invención.

15 La eficiente producción de metionina requiere la optimización de la vía específica de metionina y varias vías que proporcionan precursores. Se han descrito cepas productoras de metionina en las solicitudes de patente WO 2005/111202, WO2007/077041 y PCT/EP2007/060433.

20 Una cepa productora de metionina que expresa en exceso alelos de homoserina succiniltransferasa con sensibilidad de retroalimentación reducida a sus inhibidores SAM y metionina se describe en la solicitud de patente WO 2005/111202. La presente solicitud describe también la combinación de estos alelos con una delección del represor de metionina MetJ (GenBank 1790373), responsable de la regulación por disminución del regulón de metionina como se sugirió en la solicitud de patente JP 2000/157267. Además, las combinaciones de las dos modificaciones con la expresión en exceso de aspartocinasa/homoserina deshidrogenasa se describen en la solicitud de patente WO 2005/111202.

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

La producción de metionina se puede aumentar además usando un alelo *metB* alterado que usa preferencialmente o exclusivamente H₂S y así produce homocisteína a partir de O-succinil-homoserina como se ha descrito en la solicitud de patente WO 2004/076659.

30 El aumento adicional en la producción de metionina se puede obtener delecionando los genes *pykA*, *pykF* y/o *purU* como se describe en la solicitud de patente PCT/EP2007/060433. La presente solicitud también describe cepas productoras de metionina en las que los operones *cysPUWAM*, *cysJIH* y *gcvTHP* y los genes *serA*, *serB*, *serC*, *lpd* y *glyA* se expresan en exceso.

En *E. coli*, otras enzimas se pueden aumentar en su actividad para aumentar la producción de metionina (seguido por números de acceso y función del polipéptido correspondiente):

35 La expresión de los genes implicados en la asimilación de azufre se puede aumentar:

gen	número de acceso	función
<i>cysK</i>	1788754	cisteína sintasa
<i>CysZ</i>	g1788753	ORF en la dirección 5' de <i>cysK</i>
<i>cysN</i>	g1789108	ATP sulfurilasa
<i>cysD</i>	g1789109	sulfato adenililtransferasa
<i>cysC</i>	g1789107	adenililsulfato cinasa
<i>cysZ</i>	1788753	transporte de sulfato
<i>sbp</i>	1790351	proteína de unión a sulfato periplásmico

Las reacciones anapleróticas se pueden reforzar expresando

<i>ppc</i>	1790393	fosfoenolpiruvato carboxilasa
<i>pps</i>	1787994	fosfoenolpiruvato sintasa

Las reacciones consumidoras de acetato se pueden reforzar expresando en exceso

ES 2 739 466 T3

acs 1790505 acetil-CoA sintetasa

Además, se puede atenuar la expresión de genes en vías que degradan metionina (véase la lista de a continuación) o que se desvían de la vía de producción de metionina o se pueden delecionar los genes.

La atenuación en este contexto describe la reducción de la actividad intracelular de una enzima por mediciones tales como la reducción de su expresión, reducción de la estabilidad de la enzima, aumento de su degradación y/u otras soluciones conocidas por el experto en el campo.

5

<i>Gen</i>	<i>Entrada de Genbank</i>	<i>actividad</i>
<i>ackA</i>	1788633	acetato cinasa
<i>pta</i>	1788635	fosfotransacetilasa
<i>aceE</i>	1786304	piruvato deshidrogenasa E1
<i>aceF</i>	1786305	piruvato deshidrogenasa E2
<i>lpd</i>	1786307	piruvato deshidrogenasa E3
<i>sucC</i>	1786948	succinil-CoA sintetasa, subunidad beta
<i>sucD</i>	1786949	succinil-CoA sintetasa, subunidad alfa
<i>pck</i>	1789807	fosfoenolpiruvato carboxicinas
<i>poxB</i>	1787096	piruvato oxidasa
<i>ilvB</i>	1790104	acetohidroxiácido sintasa I, subunidad grande
<i>ilvN</i>	1790103	acetohidroxiácido sintasa I, subunidad pequeña
<i>ilvG</i>	1790202	acetohidroxiácido sintasa II, subunidad grande
	1790203	
<i>ilvM</i>	1790204	acetohidroxiácido sintasa II, subunidad pequeña
<i>ilvI</i>	1786265	acetohidroxiácido sintasa III, subunidad grande
<i>ilvH</i>	1786266	acetohidroxiácido sintasa III, subunidad pequeña
<i>aroF</i>	1788953	DAHP sintetasa
<i>aroG</i>	1786969	DAHP sintetasa
<i>aroH</i>	1787996	DAHP sintetasa
<i>thrB</i>	1786184	homoserina cinasa
<i>thrC</i>	1786185	treonina sintasa
<i>sdaA</i>	1788116	serina desaminasa
<i>sdaB</i>	1789161	serina desaminasa
<i>speD</i>	g1786311	S-adenosilmetionina descarboxilasa
<i>speC</i>	g1789337	Ornitina descarboxilasa
<i>astA</i>	g1788043	Arginina succiniltransferasa
<i>dapA</i>	g1788823	Dihidrodipicolinato sintasa

La invención también se refiere al proceso para la producción de L-metionina, sus precursores o compuestos derivados de la misma, que comprende la fermentación del microorganismo productor de metionina descrito anteriormente, la concentración de metionina, sus precursores o derivados y el aislamiento del (de los) producto(s) deseado(s) del caldo de fermentación.

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

- 5 La fermentación generalmente se realiza en fermentadores con un medio de cultivo inorgánico de composición definida conocida adaptada a las bacterias usadas, que contiene al menos una simple fuente de carbono, y si fuera necesario, un co-sustrato necesario para la producción del metabolito.

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

10 Análogamente, el medio de cultivo inorgánico para *C. glutamicum* puede ser de composición idéntica o similar al medio BMCG (Liebl et al., 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205-210) o a un medio tal como se describe por Riedel et al. (2001, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 573-583). Los medios pueden ser complementados para compensar auxotropías introducidas por mutaciones.

Después de la fermentación, L-metionina, sus precursores o compuestos derivados de los mismos, se recupera/n y purifica/n, si fuera necesario. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para la recuperación y purificación del compuesto producido, tal como metionina en los medios de cultivo.

- 20 Opcionalmente, desde 0 hasta 100 %, preferencialmente al menos 90 %, más preferencialmente 95 %, incluso más preferencialmente al menos 99 % de la biomasa se puede eliminar durante la purificación del producto de fermentación.

Según la divulgación preferida, el método para la producción de metionina comprende una etapa de aislamiento de los aminoácidos / constituyentes preferidos del caldo de fermentación y/u opcionalmente la biomasa que queda en porciones o en la cantidad total (0-100 %) en el producto final.

Los medios de reducción de la cantidad de NAM se pueden combinar con limitación o privación de fosfato y/o potasio. El experto en el campo será capaz de determinar las cantidades de fosfato o potasio necesarias para el crecimiento del organismo elegido.

30 "Someter un organismo a una limitación de un sustrato inorgánico" define una condición en la que el crecimiento de los microorganismos está gobernado por la cantidad de un producto químico inorgánico suministrado que todavía permite el débil crecimiento. Los ejemplos de estos sustratos son fosfato, potasio, magnesio o una combinación de estos.

La privación de un microorganismo de un sustrato inorgánico define la condición en la que el crecimiento del microorganismo se detiene completamente debido a la ausencia del sustrato inorgánico. Los ejemplos de estos sustratos son fosfato, potasio, magnesio o una combinación de estos.

También se desvela un microorganismo tal como se describe previamente que se optimiza para la producción fermentativa de metionina con una acumulación reducida de NAM, es decir, acumulando menores cantidades de NAM en comparación con un microorganismo no modificado, y el microorganismo que comprende las modificaciones genéticas descritas anteriormente.

40 **EJEMPLOS:**

Ejemplo 1

Construcción de la cepa MG1655 *metA11 Δ *metJ* *P**trc-metH* *P**trc36-ARNmst17-metF* *P**trcF-cysPUWAM* *P**trcF-cysJIH* Δ *pykA* Δ *pykF* *P**trc09-gcvTHP* Δ *purU* Δ *yncA::Km* (pME101-*thrA**1-*cysE-PgapA-metA**11) (pCC1BAC-*serB-serA-serC*)**

45 Para delecionar el supuesto gen de aciltransferasa *yncA* en una cepa productora de metionina, los presentes inventores usaron la cepa BW25113 Δ *yncA::Km* de *Escherichia coli* de la colección de mutantes Keio (Baba et al., 2006). Se transfirió la delección Δ *yncA::Km* por transducción de fago PI (véase a continuación) de la cepa BW25113 Δ *yncA::Km* a la cepa MG1655 *metA**11 Δ *metJ* *P**trc-metH* *P**trc36-ARNmst17-metF* *P**trcF-cysPUWAM* *P**trcF-cysJIH* *P**trc09-gcvTHP* Δ *pykA* Δ *pykF* Δ *purU* (descrita en el documento de patente PCT/EP2007/060433). Se seleccionaron transformantes resistentes a kanamicina y se verificó la inserción del casete de resistencia por análisis de PCR con los oligonucleótidos *YncAF* y *YncAR* definidos a continuación (secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>). La cepa retenida se designó MG1655 *metA**11 Δ *metJ* *P**trc-metH* *P**trc36-ARNmst17-metF* *P**trcF-cysPUWAM* *P**trcF-cysJIH* *P**trc09-gcvTHP* Δ *pykA* Δ *pykF* Δ *purU* Δ *yncA::Km*.

ES 2 739 466 T3

YncAF: GTTTGCCGATTTGCCCCACCG (homóloga a la región de *yncA* desde 1517564 hasta 1517544) (SEQ ID NO 01)

YncAR: CGCCCATCACGGTCGCAAGC (homóloga a la región de *yncA* desde 1515827 hasta 1515846) (SEQ ID NO 02)

5 Entonces, se introdujeron los plásmidos pME101-*thrA**1-*cysE*-P*gapA*-*metA**11 y pCC1BAC-*serB*-*serA*-*serC* en la cepa MG1655 *metA**11 Δ *metJ* *P**trc*-*metH* *P**trc*36-ARNmst17-*metF* *P**trcF*-*cysPUWAM* *P**trcF*-*cysJIH* *P**trc*09-*gcvTHP* Δ *pykA* Δ *pykF* Δ *purU* Δ *yncA*::Km, dando lugar a MG1655 *metA**11 Δ *metJ* *P**trc*-*metH* *P**trc*36-ARNmst17-*metF* *P**trcF*-*cysPUWAM* *P**trcF*-*cysJIH* *P**trc*09-*gcvTHP* Δ *pykA* Δ *pykF* Δ *purU* Δ *yncA*::Km (pME101-*thrA**1-*cysE*-P*gapA*-*metA**11) (pCC1BAC-*serB*-*serA*-*serC*).

10 Preparación del lisado de fago P1:

- Inoculación de 10 mL de LB complementado con kanamicina (50 μ g/mL), glucosa (0,2 %) y CaCl₂ (5 mM) con 100 μ L de cultivo durante la noche de la cepa BW25113 Δ *yncA*::Km Incubación durante 30 min a 37 °C con agitación

15 - Adición de 100 μ L del lisado de fago P1 preparado en la cepa BW25113 Δ *yncA*::Km (aproximadamente 1,10⁹ fagos/mL)

- Agitación a 37 °C durante 3 horas hasta que se lisaron todas las células

- Adición de 200 μ L de cloroformo y agitación con vórtex

- Centrifugación durante 10 min a 4500 g para eliminar el residuo celular

- Transferencia del sobrenadante a un tubo estéril y adición de 200 μ L de cloroformo

20 - Almacenamiento del lisado a 4 °C

Transducción:

- Centrifugación durante 10 min a 1500 g de 5 mL de cultivo durante la noche de la cepa MG1655 *metA**11 Δ *metJ* *P**trc*-*metH* *P**trc*36-ARNmst17-*metF* *P**trcF*-*cysPUWAM* *P**trcF*-*cysJIH* *P**trc*09-*gcvTHP* Δ *pykA* Δ *pykF* Δ *purU* en medio LB

25 - Suspensión del sedimento de células en 2,5 mL de 10 mM de MgSO₄, CaCl₂ 5 mM

- Tubos de control: 100 μ L de células

- 100 μ L de fagos P1 de la cepa BW25113 Δ *yncA*::Km

- Tubos de ensayo: 100 μ L de células + 100 μ L de fagos P1 de la cepa BW25113 Δ *yncA*::Km

- Incubación durante 30 min a 30 °C sin agitación

30 - Adición de 100 μ L de citrato de sodio 1 M a cada tubo y agitación con vórtex

- Adición de 1 mL de LB

- Incubación durante 1 hora a 37 °C con agitación

- Extensión sobre placas de Petri de LB complementadas con kanamicina (50 μ g/mL) después de la centrifugación de los tubos durante 3 min a 7000 rpm

35 - Incubación a 37 °C durante la noche

Verificación de la cepa:

Se seleccionaron transformantes resistentes a kanamicina y se verificó la presencia de la modificación de Δ *yncA*::Km por análisis de PCR con los oligonucleótidos YncAF y YncAR definidos anteriormente.

40 **Construcción de la cepa MG1655 *metA**11 Δ *metJ* *P**trc*-*metH* *P**trc*36-ARNmst17-*metF* *P**trcF*-*cysPUWAM* *P**trcF*-*cysJIH* Δ *pykA* Δ *pykF* *P**trc*09-*gcvTHP* Δ *purU* Δ *yncA*::Km Δ *argA*::Cm**

Para inactivar el gen *argA* de aminoácido acetiltransferasa, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol, mientras se deleciona la mayor parte del gen en cuestión. Para este fin se usaron dos oligonucleótidos, DargAF y DargAR (secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>):

DargAF (SEQ ID NO 03)

gtggtaaaggaacgtaaaaccgagttggctcggaggattccgccattcggttccctatatcaataccaccggggaaaaaacgTGT
AGGCTGGAGCTGCTTCG

con

- una región (minúsculas) homóloga a la región de *argA* desde 2947264 hasta 2947344,
- 5 - una región (mayúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

DargAR (SEQ ID NO 04)

ccctaaatccgcatcaaacacttggattacgctggtagttgtacaactgcttttgcctcgggcagtaaatcaatatccCATAT
GAATATCCTCCTTAG

con

- 10 - una región (minúsculas) homóloga a la región de *argA* desde 2948592 hasta 2948511,
- una región (mayúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Se usaron los oligonucleótidos DargAF y DargAR para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol a partir del plásmido pKD3. Se introdujo el producto de PCR obtenido por electroporación en la cepa MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc36-ARNmst17-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP ΔpykA ΔpykF ΔpurU ΔyncA::Km* (pKD46) en la que la enzima recombinasa Red expresada permitió la recombinación homóloga. Se seleccionaron transformantes resistentes a cloranfenicol y se verificó la inserción del casete de resistencia por análisis de PCR con los oligonucleótidos ArgAF y ArgAR definidos a continuación (secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>). La cepa retenida se designó MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc36-ARNmst17-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP ΔpykA ΔpykF ΔpurU ΔyncA::Km ΔargA::Cm*.

ArgAF: cagctgacgattgattcc (homóloga a la región de *argA* desde 2946859 hasta 2946877) (SEQ ID NO 05)

ArgAR: ggggtgttaatggcgatatcgg (homóloga a la región de *argA* desde 2949010 hasta 2948988) (SEQ ID NO 06)

Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc36-ARNmst17-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykA ΔpykF Ptrc09-gcvTHP ΔpurU ΔyncA ΔargA*

25 Para eliminar los casetes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina, se introduce el plásmido pCP20, que lleva recombinasa FLP que actúa sobre los sitios de FRT de los casetes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina, en la cepa recombinante MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc36-ARNmst17-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP ΔpykA ΔpykF ΔpurU ΔyncA::Km ΔargA::Cm* por electroporación. Después de una serie de cultivos a 42 °C, se verifica la pérdida de los casetes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina por análisis de PCR con los oligonucleótidos descritos anteriormente, *YncAF / YncAR* y *ArgAF / ArgAR*. La cepa retenida se designa MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc36-ARNmst17-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykA ΔpykF Ptrc09-gcvTHP ΔpurU ΔyncA ΔargA*.

35 **Construcción de la cepa MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc36-ARNmst17-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykA ΔpykF Ptrc09-gcvTHP ΔpurU ΔyncA ΔargA* (pME101-*thrA*1-cysE-PgapA-metA*11*) (pCC1BAC-*serB-serA-serC*)**

Se introducen los plásmidos pME101-*thrA*1-cysE-PgapA-metA*11* and pCC1BAC-*serB-serA-serC* en la cepa MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc36-ARNmst17-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP ΔpykA ΔpykF ΔpurU ΔyncA ΔargA* dando lugar a MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc36-ARNmst17-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP ΔpykA ΔpykF ΔpurU ΔyncA ΔargA* (pME101-*thrA*1-cysE-PgapA-metA*11*) (pCC1BAC-*serB-serA-serC*).

Construcción de genes sintéticos que expresan actividad de aminoácido acilasa.

Para transformar NAM en metionina, se expresaron NAM acilasas (aminoácido acilasas) en el microorganismo productor de metionina.

45 Para este fin, se prepararon genes sintéticos de los genes de *acil* aminoácido acilasa de cerdo y *Aspergillus* por la empresa Codon Devices (www.codondevices.com/). Se adaptó el uso de codones y el contenido de GC de los genes a *E. coli* según la matriz del proveedor. Todas las secuencias con el uso de codones optimizados se muestran a continuación. Se condujo la expresión de los genes sintéticos por promotores Ptrc controlados por secuencias de

operador. Se añadieron terminadores de la transcripcional en la dirección 3' de los genes. Se clonaron las construcciones en vectores pUC19 y se verificaron por secuenciación, antes de transformarlas en las cepas productoras de metionina.

Acil aminoacilasa de *Aspergillus*

5 Secuencia de promotor y operador

Gagctgttgacaattaatcatccggctctataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcatgacacaggaaacagacc (SEQ ID NO 07)

Secuencia de acil aminoacilasa de *Aspergillus* (XP_001827519.1) (SEQ ID NO 8)

Mttstvsvllsslmqstqstsheqelahflddhlnlgytverlpiaegstrenvyaylgtqrktrvcltshldtvpvyiplriegstiy
grgacddkpgmaaqicaleelraegavkegdvllfvvgeekggpgmiaanhqdlstfegvifgeptegekllvghkghlvfe
ligegkachsgypqhgvnanfalielstfvqtefpssllgpstfnvgkieggvsynivpetskalcavrvatdmagikkivsd
tvarhsnvrlefkfeypetlldhdvegsfnvrscymnrsilvahgdneqieidelmegvraykklmhalnsar

(SEQ ID NO 9)

atgaccacgtcgcagctgtttctctgctgagttcactgatgcagacacaatccacctcggaacacgagcaggaactggcgcacttt
ctggatgacctctgacaaacctgggatatactgtcagcgtctgccgattgcagaagggtccactcgcgagaacgtctacgcata
tctggggacccaacgtaaaacgcgtgtatgtctgacctctcacctggatactgttccgccgtacatcccgtcgcgtattgaggcag
tacaatctatggtcgcgggctgtgacgataagggcccgatgctgcacagatctcgcgtctggaagagctcgcgtgctgaaggt
gcggtcaaaagaaggcgcagtagtctgctgttcgtcgttggggaggaaaaaggcggccggcgcagcagcgaaccacca
ggatctgtctttgaaggggttattttgggaaccgacggaaggcaagctggtagtaggtcacaaggcactggttttgagct
gatcggtaggggaaaggctgtcactccggctaccggcaacacggtgtgaacgcgaatttcgccctgattgagacactgtcggatt
ttgtccagacggagttcctagctctagctctgctggggccgcaacatttaacgttggcaagatcgaaggtggcgtatcctataatatt
gtgccggaacgtcgaagccctgtgtcagtgccgcttgcgacggacatggccggatcaaaaagattgtgagcgataccgta
gcacgtcactctaactcgcctggagtcaagttgaatatccagagacactgctggaccatgatgttgaagggagtttaattgtc
gttctctgtttatgaaccgtccatcctggttcccacggagacaatgagcaaatgaaatcgatgaactgatggagggagtagc
gcgcctataaaaagctgacaatgcacgccctgaactcagcccgttaa

10 Secuencia terminadora de la transcripción: (ref: Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Apr 24;98(9):5019-24.)

Tcacactggctcacctcgggtggccctttctgc (SEQ ID NO 10)

Acil aminoacilasa de cerdo

15 Secuencia de promotor y operador

Gagctgttgacaattaatcatccggctctataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcatgacacaggaaacagaaac (SEQ ID NO 11)

Secuencia de acil aminoacilasa de cerdo (NP_999061.1) (SEQ ID NO 12)

Maskgregehpsvtlfrqylrirtvqpepdygaavafleerarqlglgcqkvevvpghvvtvltwpgtnptlssillnshtdvpv
vfkehwhshdpfegfkdadgyiyrgaqdmkcvsiqyleavrllkveghhfprihmtfvpdeevgghqgmelfvkrpefq
alragfaldecglasptdafvfyrcspwwlrvtstgkpgghsrficdtaacklhkvinsilafrekcckqrlqsnqlkpgavtsvnl
tmlcggvaynvpatmsacfdfrvdpvdllkafccqlqswcqaagcgvtfcfvqkwmetqvtstddsdpwaaafsgvfk
dmklaleleicpastdaryiraagvpalgfspmnhpvlldhderlhevflrgvdiytqllsalasvpalpses

(SEQ ID NO 13)

atggcgagcaaagccgftgaaggfagcatccgtctgtgaccctgtttccagatctgcgtatcgcggttcagcctgaacc
 ggattacggagcagctgtggcttctctggaggaacgcgctcgtcagctgggtctgggttgccaaaaggtagaagttgccaggg
 cacgtcgtactgtactgactggcctggaacgaatccgaccctgagttcaatctgctgaactcccatacagatgtagtgccagtgt
 tcaaggaacattggagtcagacccttgaagggftaaagatgccgatggctatattacggctgtggggcacaggacatgaagt
 gtgtatccattcaatctggaagctgttcgcccgtctgaaagtgaagggcaccactttccacgcactattccatgactttcgtgcctg
 acgaggaagtctgggggtcaccaaggtatggaactgttcgtaaacgcctgagttcaggcactgctgctggggtttgctctggac
 gagggtctggcgagcccacagacgcggttaccgtgtttacagtgaaacgttcgcttgggtgctgctgcttactccacagtaag
 ccggggcacggctcgcgtttcatcgaggatacagccgctgaaaagctgcacaaagttattaatagcatcctggcctttcgcgagaa
 ggaaaagcaacgtctgcagagcaaccagctgaaaccgggtcgggtcactagcgtgaatctgactatgctggaggggggtgctg
 cctataacgtgtgcccgcaactatgagcgcgtctgactttcgcgtgactccggatgtgacctgaaagccttcaagaacaact
 gcagagctgggtcaagcagcgggagaaggtgtaacctttgagttcgtccagaaatgagtgaaacacaggttacctcactgat
 gatagcgatecttgggtggcagcctttctgggtgttcaagatagaagctggcgtggaactggaatctgccagcagatgaca
 gacgctctttacatccgcgcccagggctaccagccctgggttttaccgatgaatcacacgcggctctgctgcatgatcacga
 tgagcgcctgcatgaggcagtttctgcgcccgtcgcacatttataccaactgctgagtgactggcttctgttctgctgcca
 tcggaatca

Secuencia terminadora de la transcripción: (ref: Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Apr 24;98(9):5019-24.)

Tcacactggctcacctcgggtggcctttctgc (SEQ ID NO 10)

5 **Ejemplo 2**

Producción de metionina en condiciones de fermentación

Se probaron cepas que produjeron cantidades sustanciales de metabolitos de interés en condiciones de producción en fermentadores de 2,5 L (Pierre Guerin) usando una estrategia de lotes alimentados con privación de fosfato.

10 Para detener el crecimiento a una concentración celular de 30 g.L⁻¹, se añadió fosfato a 28,7 mM al medio mineral B1b. El medio de lotes alimentados F1 estuvo libre de fosfato.

Brevemente, se usó un cultivo de 8 horas cultivado en 10 mL de medio LB con 2,5 g.L⁻¹ de glucosa para inocular un precultivo de 24 h en medio mínimo B1a. Estos cultivos se cultivaron en 500 mL de matraces con deflectores que contenían 50 mL de medio mínimo (B1a) en un agitador rotatorio (200 rpm) a 37 °C.

Tabla 1: Composiciones de medio mineral de lotes de cultivo (B1a y B1b).

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹) de B1a	Concentración (g.L ⁻¹) de B1b
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
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00	1,00
CaCl ₂ .H ₂ O	0,08	0,08
Ácido cítrico	1,70	1,70
KH ₂ PO ₄	2,50	2,50
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,38	1,38

ES 2 739 466 T3

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹) de B1a	Concentración (g.L ⁻¹) de B1b
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,6040	0,6040
Citrato de Fe(III) H ₂ O	0,11	0,11
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	3,70	3,70
EDTA	0,0080	0,0080
Tiamina	0,01	0,01
Glucosa	15,00	20,00
Vitamina B12	0,01	0,01
NaOH 8 N	Ajustado hasta pH 6,8	Ajustado hasta pH 6,8
IPTG	0,0024	0,0024
MOPS	5,00	0,00

Tabla 2: Composición de medio de lotes alimentados de cultivo (F1).

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ , 2H ₂ O	0,0104
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,0012
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,0120
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,0020
H ₃ BO ₃	0,0024
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,0020
Citrato de Fe(III) H ₂ O	0,0524
MgSO ₄	5,00
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	44,10
EDTA	0,0067
Tiamina	0,01
Glucosa	500,00
Vitamina B12	0,01
IPTG	0,0190

5 Posteriormente, se llenaron fermentadores de 2,5 L (Pierre Guerin) con 600 mL de de medio mínimo (B1b) y se inocularon hasta una concentración de biomasa de 0,1 g.L⁻¹ con un volumen de precultivo que variaba desde 25 hasta 45 mL.

10 Se mantuvo constante la temperatura del cultivo a 37 °C y el pH se mantuvo al valor de trabajo (6,8) por adición automática de disoluciones de NH₄OH (NH₄OH al 10 % durante 10 horas y 24 % hasta el fin del cultivo). Se estableció la tasa de agitación inicial a 200 rpm durante la fase de lotes y se aumentó hasta 1200 rpm durante la fase de lotes alimentados. Se estableció el caudal de aire inicial a 40 NL.h⁻¹ durante la fase de lotes y se aumentó hasta 100 NL.h⁻¹ al principio de la fase de lotes alimentados. Se mantuvo la concentración de oxígeno disuelto a valores entre 20 y 40 %, preferencialmente 30 % de saturación aumentando la agitación.

Cuando la masa de células alcanzó una concentración próxima a 5 g.L⁻¹, empezaron los lotes de alimentación con un caudal inicial de 5 mL.h⁻¹. Se inyectó la disolución de alimentación con un perfil sigmoide con un caudal creciente que alcanzó 21 mL.h⁻¹ después de 21 horas. Se calcularon las condiciones de alimentación precisas por la ecuación:

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

5 donde Q(t) es el caudal de alimentación en mL.h⁻¹ para un volumen de lote de 600 mL con p1 = 1,15, p2 = 18,32, p3 = 0,270, p4 = 5.

Después de 21 horas de lotes alimentados, la concentración alcanzó 30 g.L⁻¹, se agotó el fosfato del medio y las células entraron en privación de fosfato. En ese momento, aumentó la inyección de disolución de alimentación hasta un valor constante de 37 mL.h⁻¹ durante 4 horas. Entonces, se redujo el caudal constante hasta 10 mL.h⁻¹ y este valor de flujo se mantuvo hasta el fin del lote alimentado (50 horas).

10
15
15 Tabla 3: Rendimiento máximo de metionina/glucosa (R_{met}), rendimiento de metionina + N-acil-metionina + N-propionil-metionina/glucosa (R_{met + NAM}), rendimiento de N-acetil-metionina/glucosa y rendimiento de N-propionil-metionina/glucosa (se contaron N-acetil-metionina y N-propionil-metionina como metionina, % g/g véase a continuación) obtenidos en fermentaciones de lotes alimentados de las cepas descritas anteriormente. Para la definición prevista de los rendimientos véase a continuación. Se muestran los valores medios de tres series de fermentación para la cepa de referencia 1 y de dos series de lotes alimentados para la cepa 1 DyncA. La cepa 1 corresponde a MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc36-ARNmst17-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH ΔpykA ΔpykF Ptrc09-gcvTHP ΔpurU (pME101-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11) (pCC1BAC-serB-serA-serC)*.

Cepa	R _{met} (%g.g ⁻¹)	R _{met + NAM} (% g.g ⁻¹)	R _{N-acetil-metionina} (% g.g ⁻¹)	R _{N-propionilmetionina} (% g.g ⁻¹)
Cepa de resistencia (Cepa 1)	16,97 ± 1,00	20,03 ± 0,83	2,65 ± 0,17	0,41 ± 0,13
Cepa 1 DyncA	18,33 ± 1,37	18,62 ± 1,24	0,27 ± 0,15	0,02 ± 0,01

20 **Determinación del rendimiento de metionina/glucosa (R_{met})**

Se cuantificó por HPLC la concentración de metionina extracelular después de la derivatización por OPA/FMOC. Se analizaron usando HPLC las concentraciones de N-acetil-metionina y glucosa residual con detección refractométrica. Se determinó la concentración de N-propionil-metionina por CG-EM después de la siliación, se expresó como equivalente de N-acetil-metionina.

25 Se calculó el volumen del fermentador añadiendo al volumen inicial la cantidad de disoluciones añadidas para regular el pH y para alimentar el cultivo y restando el volumen usado para el muestreo y la pérdida por evaporación.

30 Se siguió continuamente el volumen de lotes alimentados pesando la disolución madre de alimentación. Entonces se calculó la cantidad de glucosa inyectada basándose en el peso inyectado, la densidad de la disolución y la concentración de glucosa controlada por el método de Brix ([Glucosa]). Se expresó el rendimiento de metionina como sigue:

$$R_{Met} = \frac{Metionina_t * V_t - Metionina_0 * V_0}{Glucosa consumida_t} * 100$$

con Metionina₀ y Metionina_t respectivamente las concentraciones de metionina inicial y a tiempo (t) y V₀ y V_t los volúmenes inicial y en el instante t.

Se calculó R_{N-acetil-metionina} del siguiente modo:

35
$$R_{N-acetil\ metionina} = \frac{N-acetil\ metionina_t * V_t}{Glucosa\ consumida_t} * 100 * 0,1492,$$

con N-acetil-metionina_t la concentración en mmoles por litro en el instante t.

La R_{N-propionil metionina} se calculó del siguiente modo:

$$R_{N-propionil\ metionina} = \frac{N-propionil\ metionina_t * V_t}{Glucosa\ consumida_t} * 100 * 0,1492,$$

con N-propionilmetionina_t la concentración en mmoles por litro en el instante t. Se calculó R_{Met + N-acetil-metionina + N-propionil-metionina} (R_{Met + NAM}) del siguiente modo:

$$R_{Met+NAM} = \frac{Metionina_t * V_t + N-acetil\ metionina * V_t * 0,1492 + N-propionil\ metionina * V_t * 0,1492}{Glucosa\ consumida_t} * 100$$

5 con Metionina_t la concentración de metionina en g por litro, N-acetil-metionina_t y N-propionil-metionina_t las concentraciones respectivas en mmoles por litro en el instante t.

La glucosa consumida se calculó del siguiente modo:

$$Volumen\ a\ lim\ entado_t = \frac{peso\ a\ lim\ entado_0 - peso\ a\ lim\ entado_t}{densidad\ de\ la\ disolución\ a\ lim\ entada}$$

Glucosa inyectada_t = Volumen alimentado_t * [Glucosa]

Glucosa consumida_t = [Glucosa]₀ * V₀ + Glucosa inyectada - [Glucosa]_{residual} * V_t

10 con [Glucosa]₀, [Glucosa], [Glucosa]_{residual} respectivamente las concentraciones de glucosa inicial, alimentada y residual.

Ejemplo 3

Adaptación de las condiciones de cultivo añadiendo aminoácido acilasa al medio de fermentación

15 Para transformar N-acetil-metionina en metionina y acetato se añadieron 160 U de N-aminoácido acilasa (riñón porcino, Sigma) a 200 µL de caldo de fermentación después de la serie de fermentación de la cepa 1 (realizada como se ha descrito anteriormente). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 2 h. Posteriormente se determinaron las concentraciones de metionina y N-acetil-metionina como se ha descrito anteriormente. Se transformaron 75-95 % de N-acetil-metionina en metionina por este tratamiento enzimático.

Referencias no patente

- 20 - Figge RM (2006), ed Wendisch VF, Microbiol Monogr (5) Amino acid biosynthesis p164-185,
 - Polevoda & Sherman 2000 JBC 275, 47, pp 36479-36482,
 - Driessen et al. 1985, CRC Crit. Rev. Biochem. 18, 281-325,
 - Marvil & Leisinger 1977 JBC 252, 10 pp. 3295-3303,
 - Javid-Majd & Blanchard 2000 Biochemistry 39, 1285-93,
 25 - Giardina et al 2000 Eur. J. Biochem. 267, 6249-55,
 - Gentzen et al. 1980 Z. Naturforsch 35 c, 544-50,
 - Manting & Driessen 2000 Mol Microbiol 37, 226-38,
 - Choi & Lee 2004 Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 625-635,
 - Jacob-Dubuisson et al. 2004 Biochim et Biophys Act 1694 235-257,
 30 - José & Meyer 2007 Microbiol and Molecul Biol Rev 71, 600-19,
 - Shokri et al 2003 Appl Microbiol Biotechnol 60, 654-64,
 - Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:120-128,
 - Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York,
 35 - Schaefer et al. (1999, Anal. Biochem. 270: 88-96),
 - Liebl et al., 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205-210,
 - Riedel et al. (2001, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 573-583),
 - Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645,

ES 2 739 466 T3

- Carrier and Keasling (1998) Biotechnol. Prog. 15, 58-64,
- Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> METABOLIC EXPLORER FIGGE, RAINER SOUCAILLE, PHILIPPE BESTEL-CORRE, GWENAELE

<120> PRODUCCIÓN DE METIONINA SIN N-ACIL-METIONINA

<130> D26313

10

<150> US 12/370.422

<151> 12-02-2009

<150> PCT/EP2008/061005

15

<151> 22-08-2008

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.3

20

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 1

30

gtttgccgattgccccacc g 21

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

35

<213> Artificial

<220>

ES 2 739 466 T3

<223> Oligonucleótido

<400> 2
cgcccatcacggtcgcaagc 20

5

<210> 3
<211> 101
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 3

15

gtggtaaagg aacgtaaaac cgagttggtc gagggattcc gccattcggg tccctatata 60
aataccacc ggggaaaaac gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 4
<211> 102
<212> ADN
<213> Artificial

20

<220>
<223> Oligonucleótido

25

<400> 4

ccctaaatcc gccatcaaca ctttggattt acgctggtag ttgtacaact gctttttgct 60
ctcgggcagt aatcaatat cccatatgaa tatectcett ag 102

30

<210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

35

<220>

ES 2 739 466 T3

<223> Oligonucleótido

<400> 5
cagctgacgatttgattcc 19

5

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 6
gggtgtttaatggcgatatcgg 23

15

<210> 7
<211> 83
<212> ADN
<213> Aspergillus niger

20

<400> 7

gagctgttga caattaatca tccggctcgt ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa 60
tttcatgaca caggaaacag acc 83

25

<210> 8
<211> 331
<212> PRT
<213> Aspergillus niger

30

<400> 8

ES 2 739 466 T3

Met Thr Thr Ser Thr Val Val Ser Leu Leu Ser Ser Leu Met Gln Thr
1 5 10 15

Gln Ser Thr Ser Glu His Glu Gln Glu Leu Ala His Phe Leu Asp Asp
20 25 30

His Leu Thr Asn Leu Gly Tyr Thr Val Glu Arg Leu Pro Ile Ala Glu
35 40 45

Gly Ser Thr Arg Glu Asn Val Tyr Ala Tyr Leu Gly Thr Gln Arg Lys

ES 2 739 466 T3

<212> ADN

<213> Aspergillus niger

<400> 9

5

```

atgaccacgt cgactgtcgt ttctctgctg agttcactga tgcagacaca atccacctcg      60
gaacacgagc aggaactggc gcactttctg gatgaccatc tgacaaacct gggatatact      120
gtcagagcgtc tgcgattgc agaagggtcc actcgcgaga acgtctacgc atatctgggg      180
acccaacgta aaacgcgtgt atgtctgacc tctcactcgg atactgttcc gccgtacatc      240
ccgctgcgta ttgagggcag tacaatctat ggtcgcgggg cttgtgacga taagggcccg      300
atggctgcac agatctgcgc tctggaagag ctgctgctg aaggtgcggt caaagaaggc      360
gacgtaggtc tgctgttcgt cgttggggag gaaaaaggcg gtccgggcat gatcgcagcg      420
aaccaccagg atctgtcttt tgaaggggtt atttttgggg aaccgacgga aggcaagctg      480
gtagtaggtc acaaagggca cctggttttt gagctgatcg gtgagggaaa ggettgtcac      540
tccgctacc cgcaacacgg tgtgaacgcg aatttcgccc tgattgagac actgtcggat      600
tttgtccaga cggagtttcc tagctctagt ctgctggggc cgtcaacatt taacgttggc      660
aagatcgaag gtggcgtatc ctataatatt gtgccggaaa cgtcgaagc cctgtgtgca      720
gtcgcgcttg cgacggacat ggccggtatc aaaaagattg tgagcgatac cgtagcacgt      780
cactctaacg tccgcctgga gttcaagttt gaatatccag agacactgct ggaccatgat      840
gttgaagggg gttttaatgt gcgttcctgc tgttatatga accgctccat cctggttgcc      900
cacggagaca atgagcaaat tgaaatogat gaactgatgg agggagtacg cgcctataaa      960
aagctgacaa tgcacgccct gaactcagcc cgctaa      996

```

<210> 10

<211> 34

10

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia terminadora de la transcripción

15

<400> 10

tcacactggctcacctcgggtgggccttctgc 34

<210> 11

20

<211> 83

<212> ADN

ES 2 739 466 T3

<213> Sus scrofa

<400> 11

gagctggtga caattaatca tccggetcgt ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa 60
tttcatgaca caggaaacag aac 83

5

<210> 12

<211> 407

<212> PRT

<213> Sus scrofa

10

<400> 12

ES 2 739 466 T3

Met Ala Ser Lys Gly Arg Glu Gly Glu His Pro Ser Val Thr Leu Phe
 1 5 10 15

Arg Gln Tyr Leu Arg Ile Arg Thr Val Gln Pro Glu Pro Asp Tyr Gly
 20 25 30

Ala Ala Val Ala Phe Leu Glu Glu Arg Ala Arg Gln Leu Gly Leu Gly
 35 40 45

Cys Gln Lys Val Glu Val Val Pro Gly His Val Val Thr Val Leu Thr
 50 55 60

Trp Pro Gly Thr Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile Leu Leu Asn Ser His
 65 70 75 80

Thr Asp Val Val Pro Val Phe Lys Glu His Trp Ser His Asp Pro Phe
 85 90 95

Glu Gly Phe Lys Asp Ala Asp Gly Tyr Ile Tyr Gly Arg Gly Ala Gln
 100 105 110

Asp Met Lys Cys Val Ser Ile Gln Tyr Leu Glu Ala Val Arg Arg Leu
 115 120 125

Lys Val Glu Gly His His Phe Pro Arg Thr Ile His Met Thr Phe Val
 130 135 140

Pro Asp Glu Glu Val Gly Gly His Gln Gly Met Glu Leu Phe Val Lys
 145 150 155 160

Arg Pro Glu Phe Gln Ala Leu Arg Ala Gly Phe Ala Leu Asp Glu Gly
 165 170 175

Leu Ala Ser Pro Thr Asp Ala Phe Thr Val Phe Tyr Ser Glu Arg Ser
 180 185 190

Pro Trp Trp Leu Arg Val Thr Ser Thr Gly Lys Pro Gly His Gly Ser
 195 200 205

ES 2 739 466 T3

Arg Phe Ile Glu Asp Thr Ala Ala Glu Lys Leu His Lys Val Ile Asn
 210 215 220

Ser Ile Leu Ala Phe Arg Glu Lys Glu Lys Gln Arg Leu Gln Ser Asn
 225 230 235 240

Gln Leu Lys Pro Gly Ala Val Thr Ser Val Asn Leu Thr Met Leu Glu
 245 250 255

Gly Gly Val Ala Tyr Asn Val Val Pro Ala Thr Met Ser Ala Cys Phe
 260 265 270

Asp Phe Arg Val Ala Pro Asp Val Asp Leu Lys Ala Phe Glu Glu Gln
 275 280 285

Leu Gln Ser Trp Cys Gln Ala Ala Gly Glu Gly Val Thr Phe Glu Phe
 290 295 300

Val Gln Lys Trp Met Glu Thr Gln Val Thr Ser Thr Asp Asp Ser Asp
 305 310 315 320

Pro Trp Trp Ala Ala Phe Ser Gly Val Phe Lys Asp Met Lys Leu Ala
 325 330 335

Leu Glu Leu Glu Ile Cys Pro Ala Ser Thr Asp Ala Arg Tyr Ile Arg
 340 345 350

Ala Ala Gly Val Pro Ala Leu Gly Phe Ser Pro Met Asn His Thr Pro
 355 360 365

Val Leu Leu His Asp His Asp Glu Arg Leu His Glu Ala Val Phe Leu
 370 375 380

Arg Gly Val Asp Ile Tyr Thr Gln Leu Leu Ser Ala Leu Ala Ser Val
 385 390 395 400

Pro Ala Leu Pro Ser Glu Ser
 405

<210> 13

<211> 1221

5 <212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 13

atggcgagca aaggccgtga aggtgagcat ccgtctgtga ccctgtttcg ccagtatctg 60
 10 cgtattcgca cggttcagcc tgaaccggat tacggagcag ctgtggettt cctggaggaa 120

ES 2 739 466 T3

cgcgctcgtc agctgggtct gggttgccaa aaggtagaag ttgtcccagg gcacgctgta	180
actgtactga cttggcctgg aacgaatccg accctgagtt caatcctgct gaactcccat	240
acagatgtag tgccagtgtt caaggaacat tggagtcacg accctttcga agggtttaaa	300
gatgcogatg gctatattta cggtcgtggg gcacaggaca tgaagtgtgt atccattcaa	360
tatctggaag ctgttcgccc tctgaaagtt gaagggcacc actttccacg cactattcac	420
atgactttcg tgccctgacga ggaagtccgg ggtoaccaag gtatggaact gttcgtaaaa	480
cgcocctgagt ttcaggcaact gcgtgcgggt tttgctctgg acgagggctc ggcgagcccg	540
acagacgcgt ttaccgtgtt ttacagtcaa cgttcgcctt ggtggctgcg cgttacttcc	600
acaggtaagc cggggcacgg ctccgctttc atcgaggata cagccgctga aaagctgcac	660
aaagttatta atagcatcct ggcctttcgc gagaaggaaa agcaacgtct gcagagcaac	720
cagctgaaac cgggtgcggt cactagcgtg aatctgacta tgctggaggg ggggtgcgcc	780
tataacgttg tgccggcaac tatgagcgcg tgcttcgact ttcgcgtagc tccgatggt	840
gacctgaaag ctttcgaaga acaactgcag agctggtgtc aagcagcggg agaaggtgta	900
acctttgagt tcgtccagaa atggatggaa acacaggtta cctcgactga tgatagcgat	960
ccttggtggg cagccttttc tgggtgtgtc aaagatatga agctggcgtt ggaactggaa	1020
atctgccag cgagtacaga cgctcgttac atccgcgccg caggcgtacc agccctgggt	1080
ttttcaccga tgaatcacac gccggtcctg ctgcatgate acgatgagcg cctgcatgag	1140
gcagttttcc tgccggcgt cgacatttat acccaactgc tgagtgcact ggtttctgtt	1200
cctgcgctgc catcggaatc a	1221

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de metionina, o sus precursores, en un proceso fermentativo que comprende las siguientes etapas:
- 5 - cultivar un microorganismo modificado en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, una fuente de azufre y una fuente de nitrógeno, y
- recuperar metionina y/o sus derivados del medio de cultivo,
- en donde la acumulación de N-acil metionina se reduce en comparación con un microorganismo no modificado y/o método, por una de las siguiente modificaciones:
- 10 ◦ Atenuación de la expresión de al menos una enzima metionina transacilasa, y/o
- Expresión o potenciamiento de la expresión de al menos una amino acilasa específica de metionina; y/o
- Adición de una N-acil aminoácido acilasa al medio.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la N-acil metionina cuya acumulación se reduce se elige entre el siguiente grupo: N-acetil-metionina, N-propionil-metionina, N-butil-metionina, y sus combinaciones.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en donde la enzima metionina transacilasa cuya expresión se atenúa está codificada por un gen seleccionado entre *yncA*, *argA*, *yjdJ*, *yfaP*, *yedL*, *yjhQ* y sus combinaciones.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la producción de N-acil-metionina se reduce atenuando la expresión de al menos uno de los siguientes genes *yncA*, *argA*, *yjdJ*, *yfaP*, *yedL*, *yjhQ* que codifican enzimas metionina N-aciltransferasa y añadiendo una aminoácido acilasa al medio.
- 20 5. El método de las reivindicaciones 1, en donde la fuente de azufre en el medio de cultivo es sulfato, tiosulfato, sulfuro de hidrógeno, ditionato, ditionito, sulfito, metilmercaptano, disulfuro de dimetilo, o una combinación de las diferentes fuentes.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la fuente de azufre en el medio de cultivo es sulfato o tiosulfato, o una mezcla de los dos.
7. El método de la reivindicación 1, en donde la fuente de carbono se obtiene de materia prima renovable.
- 25 8. El método de la reivindicación 1, en donde la fuente de carbono es glucosa o sacarosa.
9. El método de la reivindicación 1, en donde la fuente de nitrógeno se suministra en forma de amonio o amoniaco.
10. El método de la reivindicación 1, en donde el microorganismo se limita o se priva de fosfato y/o potasio.