

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 226**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2016 PCT/EP2016/076281**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017 WO17089077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2016 E 16790964 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3380627**

54 Título: **Procedimiento de producción de L-metionina**

30 Prioridad:

27.11.2015 EP 15196776

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

16.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**OCHROMBEL, INES;
FISCHER, DANIEL;
BATHE, BRIGITTE;
HASSELMEYER, MARLEEN;
HAMPEL, MICHAEL y
PEDALL, JOANNE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 748 226 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de L-metionina

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de L-metionina, en el que un microorganismo que tiene actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa y actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa se cultiva en presencia de L-homoserina y metilmercaptano, una sal del mismo o disulfuro de dimetilo, mediante el que se acumula la L-metionina en el medio de cultivo.
- 10 El aminoácido metionina se produce actualmente industrialmente en todo el mundo en grandes cantidades y tiene una importancia comercial considerable. La metionina se emplea en muchos campos, tales como productos farmacéuticos, para la salud y de acondicionamiento físico, pero particularmente como aditivo para piensos en muchos piensos para diversos animales de ganadería, pudiendo utilizarse tanto la forma racémica como la enantioméricamente pura de metionina.
- 15 A escala industrial, la metionina se produce químicamente por medio de la reacción de Bucherer-Bergs, que es una variante de la síntesis de Strecker. En este caso, las sustancias de partida metilmercaptopropionaldehído (preparado a partir de acroleína y metilmercaptano), cianuro de hidrógeno, amoniaco y dióxido de carbono se hacen reaccionar proporcionando 5-(2-metilmercaptoetil)hidantoína (metionina-hidantoína), que se hidroliza subsiguientemente por álcalis proporcionando el metioninato de metal alcalino, liberándose después la metionina por medio de neutralización con ácido (documento EP 0 780 370 A2). También se pueden utilizar otros diversos procedimientos para preparar metionina, por ejemplo, la reacción de amidocarbonilación, la hidrólisis de proteínas o la fermentación de microorganismos productores de metionina. En síntesis química, la metionina se produce en forma de una mezcla racémica de D- y L-metionina, mientras que la L-metionina, o precursores configurados en L de la misma, L-homoserina, por ejemplo, se pueden producir mediante la fermentación de microorganismos adecuados.
- 20 La L-homoserina, un precursor potencial de L-metionina (H.J. Teas *et al.*, J. Biol. Chem 1948, 172: 651-658), se puede producir tanto químicamente (M.D. Armstrong, J. Am. Chem Soc., Vol. 70, 1756-1759, 1948) como por fermentación por medio de microorganismos (véanse, por ejemplo, los documentos US 3.598.701, US 6.303.348 B1, EP 0 994 190 A2, EP 1 149 911 A2, WO 2004/067757 A1).
- 30 Hateley *et al.* divulgan un procedimiento en el que se obtiene L-metionina por medio de una ruta química partiendo de L-homoserina (documento WO 2007/085514 A2).
- 35 Lievense ha podido demostrar que cepas de microorganismos que carecen de actividad de homocisteína metilasa, cuya producción de L-homoserina se había regulado al alza y que se habían transformado con un plásmido que codifica una L-homoserina acetiltransferasa y una O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa (O-acetilhomoserina (tiol)-liasa), produjeron L-metionina en exceso de su propia necesidad en presencia de metilmercaptano, a diferencia de la cepa original (*E. coli*, *C. glutamicum* o *B. flavum*) (documento WO 93/17112 A1).
- 40 Bolten *et al.* (J. Microbiol. Biotechnol. (2010), 20 (8), 1196-1203) pudieron mostrar que *C. glutamicum* (de tipo silvestre) es capaz de crecer en metilmercaptano y en su forma dimérica, disulfuro de dimetilo, como únicas fuentes de azufre en lugar de sulfato, la fuente de azufre más común para el cultivo de microorganismos, e investigaron las rutas y enzimas subyacentes. Demostraron que la MetY (O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa) es responsable de la sustitución del grupo acetilo de O-acetil-L-homoserina por el grupo mercapto de metilmercaptano o de disulfuro de dimetilo para producir directamente L-metionina. A fin de aumentar la producción de L-metionina, los autores sugieren la amplificación no solo de MetY, sino también de otras enzimas de la biosíntesis de L-metionina.
- 45 Zelder *et al.* (documento WO 2007/011939 A2) demostraron que la L-metionina puede producirse en microorganismos, tales como *E. coli* y *C. glutamicum*, cultivando los microorganismos que tienen una O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa u O-succinil-L-homoserina sulfhidrilasa y/o L-homoserina acetiltransferasa o L-homoserina succiniltransferasa desreguladas en presencia de un compuesto de sulfuro encapsulado en metilo, tal como el disulfuro de dimetilo o trisulfuro de dimetilo.
- 50 Un procedimiento biotecnológico de dos etapas para preparar L-metionina se propuso por Kim *et al.* (documento WO 2008/013432 A1). En una primera etapa, a este respecto, se obtiene inicialmente un precursor de L-metionina, O-succinil-L-homoserina u O-acetil-L-homoserina, por medio de microorganismos recombinantes, que se acumulan en el caldo de cultivo. En la segunda etapa subsiguiente, el precursor de L-metionina se hace reaccionar con metilmercaptano en presencia de una proteína que tiene actividad de O-succinil-L-homoserina sulfhidrilasa o actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa o en presencia de un microorganismo que produce dicha proteína o un digestor celular de este microorganismo, para dar L-metionina y el ácido carboxílico correspondiente, es decir, acetato o succinato.
- 60 Sin embargo, en esta reacción enzimática, se forman cantidades equimolares de acetato o succinato además de L-metionina. La elección de O-acetil-L-homoserina como precursor de L-metionina, por ejemplo, conduce a altas concentraciones de acetato en el transcurso de la reacción, particularmente a escala industrial. A un pH externo
- 65

bajo, las moléculas de acetato no disociadas pueden introducirse en la célula a través de la membrana y desprotonarse dentro de la misma, lo que conduce a una caída en el pH interno del citoplasma y altera la homeostasis del pH celular (I.R. Stand, *Microbiological Reviews* 49, N° 4 (1985), 359-378). Además, el acetato no puede eliminarse completamente del producto de L-metionina sin tener que realizar un esfuerzo inaceptable. En consecuencia, Hong *et al.* (documento WO 2012/091479 A2) proponen numerosos procedimientos para eliminar y reutilizar las cantidades relativamente grandes de acetato generadas en la segunda etapa del proceso de producción de L-metionina a partir del producto de L-metionina.

El objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para producir L-metionina en un microorganismo en el que el mismo microorganismo reutilice sustancialmente el acetato formado en la conversión de O-acetil-L-homoserina en L-metionina.

Este objeto se logra mediante un procedimiento para producir L-metionina en el que un microorganismo que tiene actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa y actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa se cultiva en un medio de cultivo que comprende L-homoserina y una fuente de azufre, seleccionándose la fuente de azufre del grupo que consiste en metilmercaptano (MC), una sal de metilmercaptano y disulfuro de dimetilo (DMDS), mediante el que se acumula L-metionina en el medio de cultivo.

Las actividades enzimáticas en microorganismos generalmente se efectúan mediante la expresión del gen correspondiente que codifica la enzima respectiva. Los denominados promotores se encuentran aguas arriba del gen. Un promotor es una secuencia de ADN que consiste en aproximadamente 40 a 50 pares de bases y que constituye el sitio de unión para una holoenzima de ARN polimerasa y el punto de inicio de la transcripción (M. Pátek *et al.*, *Microbial Biotechnology*, 6 (2013), 103-117), mediante lo que se puede influir en la fuerza de expresión del polinucleótido o del gen controlado. Se entiende que un "enlace funcional" significa la disposición secuencial de un promotor con un gen, que conduce a una transcripción del gen.

El microorganismo también puede ser recombinante y tener una actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa mejorada y una actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa mejorada.

Las actividades enzimáticas mejoradas en microorganismos pueden efectuarse, por ejemplo, mediante mutación del gen endógeno correspondiente. Las actividades enzimáticas también pueden mejorarse aumentando la expresión del gen correspondiente, por ejemplo aumentando el número de copias del gen y/o mejorando los factores reguladores del gen. La mejora de dichos factores reguladores que influyen positivamente en la expresión génica se puede lograr, por ejemplo, modificando la secuencia del promotor aguas arriba del gen estructural a fin de aumentar la eficacia del promotor o reemplazando completamente dicho promotor por un promotor más eficaz.

En el procedimiento según la presente invención, la actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa y la actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa se potencian preferentemente mediante una expresión aumentada de un gen que codifica una proteína que tiene actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa o una proteína que tiene actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa. El aumento de la expresión génica se logra preferentemente aumentando el número de copias del gen que codifica la proteína que tiene actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa o la proteína que tiene actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa y/o mediante el enlace funcional en cada caso del gen que codifica la proteína que tiene actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa o la proteína que tiene actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa a un promotor fuerte.

Los promotores fuertes adecuados o los procedimientos para producir dichos promotores para aumentar la expresión son conocidos por la literatura (por ejemplo, S. Lissner y H. Margalit, *Nucleic Acid Research*, 1993, vol. 21, N° 7, 1507-1516; M. Pátek y J. Nesvera en H. Yukawa y M Inui (eds.), *Corynebacterium glutamicum*, *Microbiology Monographs* 23, Springer Verlag Berlín Heidelberg 2013, 51-88; B. J. Eikmanns *et al.*, *Gene*, 102 (1991) 93-98). Por ejemplo, pueden optimizarse promotores nativos alterando la secuencia del promotor en la dirección de las secuencias de consenso conocidas con respecto al aumento de la expresión de los genes unidos funcionalmente a estos promotores (M. Patek *et al.*, *Microbiology* (1996), 142, 1297-1309; M. Patek *et al.*, *Microbial Biotechnology* 6 (2013), 103-117).

Para aumentar la expresión del gen que codifica la proteína que tiene actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa (metX) o el gen que codifica la proteína que tiene actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa (metY), es adecuado, por ejemplo, el promotor *ptacl* (Ptacl), (H. A. deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 80, 21-25, enero de 1983, *Biochemistry*). La secuencia de Ptacl se muestra con el número de secuencia 5 (SEQ ID NO: 5).

Los promotores constitutivos también son adecuados para la sobreexpresión, en la que el gen que codifica la actividad enzimática se expresa continuamente bajo el control del promotor tal como, por ejemplo, el promotor deo dependiente de glucosa. Los promotores inducidos químicamente, tales como *tac*, *lac* o *trp*, también son adecuados. El sistema más extendido para la inducción de promotores es el operón *lac* de *E. coli*. En este caso, se utiliza como inductor o bien lactosa o bien isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). También son comunes como inductores sistemas que utilizan arabinosa (por ejemplo, el sistema pBAD) o ramnosa (por ejemplo KRX de *E. coli*). Un sistema de inducción física es, por ejemplo, el sistema promotor de choque frío inducido por temperatura basado en el

promotor *cspA* de *E. coli* de Takara o Lambda PL y también promotores inducibles osmóticamente, por ejemplo, *osmB* (por ejemplo, el documento WO 95/25785 A1).

5 En el procedimiento según la presente invención, el microorganismo recombinante se selecciona del grupo que consiste en Enterobacteriaceae y Corynebacteriaceae, por ejemplo una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*), por ejemplo la cepa de *E. coli* K-12 no patógena MG1655 (DSM 18039), o una cepa de *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), por ejemplo ATCC13032, o una cepa de *Corynebacterium humireducens* (*C. humireducens*), por ejemplo DSM 45392.

10 En el procedimiento según la presente invención, la actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa es, por ejemplo, la enzima MetX, que se origina a partir de *Corynebacterium glutamicum*. La enzima MetX también puede originarse a partir de *C. humireducens*. Kim *et al.* (documentos EP 2 657 345 A1; EP 2 657 250 A2) u Ochrombel *et al.* (documento WO 2015/165746 A1) divulgan ejemplos de enzimas adecuadas que tienen actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa. La enzima MetX utilizada en los ejemplos experimentales que se describen más adelante tiene la secuencia de aminoácidos según la secuencia número 2 (SEQ ID NO: 2). La secuencia de nucleótidos correspondiente para el gen *metX* se muestra con el número de secuencia 1 (SEQ ID NO: 1). La secuencia se origina a partir de *C. glutamicum* (ATTC13032) NC_003450.

20 Una actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa adecuada para el procedimiento según la presente invención es, por ejemplo, la enzima MetY, que se origina a partir de *Corynebacterium glutamicum*. La enzima MetY también puede originarse a partir de *C. humireducens*. Möckel *et al.* (documento WO 02/18613 A1), Kröger *et al.* (documento WO 2007/024933 A2) o Kim *et al.* (documento EP 2 657 345 A1) divulgan ejemplos de enzimas que tienen actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa según la invención. La enzima MetY utilizada en los ejemplos experimentales que se describen más adelante tiene la secuencia de aminoácidos según la secuencia número 4 (SEQ ID NO: 4). La secuencia de nucleótidos correspondiente al gen *metY* se muestra con el número de secuencia 3 (SEQ ID NO: 3). La secuencia se origina a partir de *C. glutamicum* (ATTC13032) NC_003450.

30 La L-homoserina se transporta a los microorganismos a través de importadores de aminoácidos de cadena ramificada, por ejemplo el sistema LIV en *Escherichia coli* (B.A. Templeton y M. A. Savageau, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 117, Nº 3, marzo de 1974, p. 1002-1009). En *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) también existe un sistema de transporte homólogo codificado por BrnQ de *cgl2310* (A. Tauch *et al.*, Arch Microbiol 169 (1998): 303-312).

35 Dentro de la célula, la L-homoserina se activa en su grupo hidroxilo mediante la transferencia del grupo acetilo de la acetil coenzima A (acetil-CoA) para dar O-acetil-L-homoserina a través de una homoserina O-acetiltransferasa (MetX) (heteróloga). La O-acetil-L-homoserina se convierte después en L-metionina y acetato en presencia de una fuente de azufre reducida, tal como metilmercaptano (MC), y de piridoxal-5'-fosfato (PLP) por medio de una sulfhidrilasa (MetY) (heteróloga). Si bien que la O-acetil-L-homoserina es uno de los intermedios naturales de la biosíntesis de metionina en corinebacterias, la biosíntesis de metionina en enterobacterias se realiza de forma análoga a través de un intermedio de O-succinil-L-homoserina (véase, por ejemplo Figge R (2007) Methionine biosynthesis in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. En: Wendisch VF (ed) Amino acid biosynthesis - pathways, regulation and metabolic engineering. Microbiology Monographs, vol 5. Springer, Berlin, p. 163-193). Por lo tanto, las actividades de L-homoserina O-acetiltransferasa y de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa deben introducirse en primer lugar de forma heteróloga en enterobacterias tales como *E. coli*, mientras que estas actividades enzimáticas ya están presentes de forma natural en corinebacterias tales como *C. glutamicum*. Los genes homólogos o heterólogos correspondientes que codifican las enzimas correspondientes pueden mejorarse mediante las medidas descritas al principio (tales como el aumento del número de copias de ambos genes y/o el uso de promotores fuertes).

50 En enterobacterias tales como *E. coli*, las actividades mejoradas de L-homoserina O-acetiltransferasa y de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa pueden introducirse mediante transformación por medio de vectores adecuados que comprenden las secuencias génicas *metX* (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) y *metY* (por ejemplo, SEQ ID NO: 3), que en cada caso se encuentran aguas arriba de un promotor fuerte (por ejemplo P_{tacl}). Un ejemplo de dicho constructo es la secuencia según la secuencia número 6 (SEQ ID NO: 6).

55 El acetato liberado por la conversión de O-acetil-L-homoserina en L-metionina, en presencia de metilmercaptano (MC) y piridoxal-5'-fosfato (PLP) y también la sulfhidrilasa (MetY) (heteróloga), se utiliza después de nuevo para la síntesis de acetil-CoA, con consumo de ATP, en el citoplasma de *E. coli* (igualmente *Bacillus subtilis*) por medio de una acetil-CoA sintetasa (*Acs*) inducible por acetato, que se activa particularmente en la fase estacionaria o en condiciones anaeróbicas por el regulador *CsrA* (S. Kumari *et al.*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 177, Nº 10, mayo de 1995, p. 2878-2886).

60 A diferencia de *E. coli*, el exceso de acetato en *C. glutamicum* se convierte exclusivamente en una reacción dependiente de ATP en acetilfosfato, por medio de una acetato quinasa (AK), que finalmente reacciona por medio de una fosfotransacetilasa (PTA) en presencia de CoA para dar acetil-CoA. Los genes correspondientes, *ack* y *pta*, están organizados en *C. glutamicum* en un operón regulado por acetato a nivel transcripcional (R. Gerstmeier *et al.*

Journal of Bacteriology 104 (103) 99-122).

La L-metionina se excreta al exterior de la célula de *E. coli* por medio del exportador YjeH (Q. Liu *et al.*, Appl Environ Microbiol 81 (2015) p. 7753-7766). Además, el gen ygaZH en *E. coli* codifica un exportador de metionina (documento WO2015/028675 A1). La L-metionina se excreta al exterior de la célula de *C. glutamicum* en el medio de cultivo con la ayuda del exportador BrnFEC. Trötschel *et al.*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, junio de 2005, p. 3786-3794).

Figura 1 Muestra el mapa del plásmido pMW218.

Figura 2: Muestra el mapa de plásmido pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY.

Figura 3: Muestra la conversión catalítica de L-homoserina y acetil-CoA por los homogeneizados celulares de MG1655/pMW218 o MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY.

Figura 4: Muestra la conversión catalítica de metilmercapturo de sodio en presencia de O-acetilhomoserina y piridoxal-5'-fosfato (PLP) por la enzima O-acetilhomoserina sulfhidrilasa (MetY). La comparación de los homogeneizados celulares de MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se muestra con las respectivas concentraciones de proteína total utilizadas.

EJEMPLOS

1) Preparación de una enterobacteria que expresa heterológicamente los genes para una L-homoserina O-acetiltransferasa y una sulfhidrilasa de una especie de corinebacterias

Sobre la base de la secuencia del genoma de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032) NC_003450, se sintetizaron las secuencias de genes metX (SEQ ID NO: 1) y metY (SEQ ID NO: 3), que codifican la L-homoserina O-acetiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 y la O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa que tiene la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 4, respectivamente, ambas con el promotor aguas arriba Ptacl (SEQ ID NO: 5) (H.A. deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 80, 21-25, enero de 1983, Biochemistry) de Life Technologies Invitrogen GeneArt (Alemania), (SEQ ID NO: 6).

En esta SEQ ID NO: 6, el promotor Ptacl es del par de bases 407 al 447, la secuencia génica de metX de 502 a 1638, el promotor Ptacl nuevamente de 1645 a 1685 y la secuencia génica de metY de 1742 a 3055.

Subsiguientemente, la clonación de esta secuencia sintética se realizó a través de los sitios de restricción BssHII y BglI en la secuencia del vector pMW218 (número de acceso: AB005477) (Nippon Gene, Toyama, Japón) (figura 1). El plásmido pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se forma a partir del mismo (figura 2). Para analizar el plásmido pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY, se llevó a cabo la secuenciación del ADN por Eurofins MWG Operon. Se verificó la corrección de las secuencias de ADN obtenidas utilizando el programa informático Clone Manager de forma que se confirmara la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6.

Los plásmidos pMW218 y pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se han transformado en cada caso en la cepa de *Escherichia coli* K-12 MG1655 (DSM N° 18039). Los transformantes se cultivaron subsiguientemente en placas de agar de medio LB con 50 µg/ml de kanamicina de forma que se pudieran generar las cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY. En cada caso, se seleccionó una colonia que se inoculó en cada caso a 10 ml de medio LB con 50 µg/ml de kanamicina, y se cultivó a 37 °C, 200 rpm, durante 6 horas. Subsiguientemente, se inocularon a 10 ml de medio A [25 g/l de sulfato de amonio; 1 g/l de sulfato de magnesio heptahidratado; 2 g/l de dihidrogenofosfato de potasio; 0,03 g/l de heptahidrato de hierro; 0,02 g/l de monohidrato de sulfato de manganeso; 20 g/l de glucosa monohidrato; 30 g/l de carbonato de calcio; 0,05 g/l de kanamicina; 0,025 g/l de piridoxal-5'-fosfato (PLP); 0,0024 g/l de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG)] 200 µl del cultivo de células en crecimiento y se incubaron a 37 °C, 200 rpm, durante 16 h. Estos cultivos celulares se diluyeron con 10 ml de medio A nuevo en un matraz de 100 ml a una DO de 2 y se cultivaron adicionalmente en condiciones idénticas hasta que se alcanzó una DO de aproximadamente 5 (aproximadamente 3-4 h). Subsiguientemente, estas células, que se encuentran en la fase de crecimiento exponencial y tienen actividad de homoserina O-acetiltransferasa (MetX) y de sulfhidrilasa (MetY), pueden utilizarse para la biotransformación. Se entiende que biotransformación significa una conversión de sustancia, en la que se utilizan células vivas enteras, células fijas o enzimas aisladas libres o unidas a un vehículo o la combinación de las anteriores.

2) Detección de las actividades enzimáticas de L-homoserina O-acetiltransferasa y acetil-L-homoserina sulfhidrilasa

Se inocularon en cada caso a 10 ml de medio LB con 50 µg/ml de kanamicina una sola colonia de las cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY y se cultivaron a 37 °C, 200 rpm, durante 6 horas. Subsiguientemente, se inocularon a 10 ml de medio A (véase el ejemplo 1) 200 µl del cultivo de células en crecimiento y se incubaron a 37 °C, 200 rpm, durante 16 h. Los cultivos celulares se recogieron cada uno (8 ml normalizados a una DO = 1), los sobrenadantes se eliminaron por centrifugación (20 min, 4000 rpm, 4 °C) y las células sedimentadas se lavaron dos veces con 800 µl de tampón de fosfato de potasio 0,1 M (pH 7,5) y se

recogieron en 1 ml de tampón. La disrupción celular mecánica se llevó a cabo en un instrumento FastPrep FP120 (QBiogene, Heidelberg), en el que las células se agitaron tres veces durante 20 s a 6,5 m/s en recipientes de digestión con 300 mg de perlas de vidrio (\varnothing 0,2-0,3 mm). El extracto bruto se centrifugó después a 12.000 rpm, 4 °C, 20 min, para eliminar las células no digeridas y los desechos celulares. La cantidad total de proteína se determinó utilizando el ensayo de cuantificación de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad, Estados Unidos). El homogeneizado celular se utilizó después para la detección enzimática de la actividad citoplasmática de L-homoserina O-acetiltransferasa y acetil-L-homoserina sulfhidrilasa.

2a) Detección de la actividad citoplasmática de MetX (L-homoserina O-acetiltransferasa)

La reacción que cataliza la enzima L-homoserina O-acetiltransferasa (MetX) [EC2.3.1.31] es la conversión de L-homoserina y acetil-CoA en O-acetil-L-homoserina y CoA. Utilizando una solución de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, "reactivo de Ellmans", Sigma Aldrich, Alemania), el progreso de esta reacción se puede registrar mediante mediciones de absorción a 412 nm, ya que el DTNB forma una sustancia amarilla con el grupo SH de CoA (S. Yamagata Journal of Bacteriology 169, N° 8 (1987) 3458-3463) El ensayo fotométrico de la enzima MetX se realizó a 37 °C, llevándose a cabo la calibración previamente utilizando concentraciones de CoA de entre 0-200 μ M. Cada preparación se realizó en una mezcla de reacción de 0,2 ml con tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,5), DNTB 0,65 mM [100 μ l de una solución madre de DTNB 1,3 mM], acetil-CoA 0,13 mM [30 μ l de una solución madre de acetil-CoA 0,886 mM, Sigma Aldrich, Alemania], L-homoserina 10 mM [20 μ l de una solución madre de L-homoserina 100 mM, Sigma Aldrich, Alemania] y la concentración de proteína especificada de 0,012 mg/ml, o 0,024 mg/ml del homogeneizado celular respectivo.

Dado que la acetil-CoA se utiliza dentro de la célula para diversas biosíntesis, hay diversas enzimas presentes en el citoplasma que catalizan la escisión de acetil-CoA en CoA, de forma que debe considerarse la diferencia entre los homogeneizados celulares con y sin MetX.

Como resultado del ensayo enzimático, se observó que el aumento de absorción de DNTB del homogeneizado celular de MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY era constantemente superior al de MG1655/pMW218 a lo largo del transcurso del tiempo (figura 3). Esto confirma que MetX, a este respecto, es catalíticamente activo como enzima adicional. La comparación de las pendientes de las regiones lineales iniciales de las curvas registradas muestra actividades en el homogeneizado celular de MG1655/pMW218 de alrededor de 580 μ mol/min por g de proteína total y en MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY de alrededor de 730 μ mol/min por g de proteína total. Por lo tanto, la diferencia es la actividad específica de la L-homoserina O-acetiltransferasa (MetX) a alrededor de 150 unidades por g de proteína total (1 unidad = 1 μ mol de conversión de sustrato/min).

2b) Detección de la actividad citoplasmática de MetY (O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa)

La reacción que cataliza la enzima O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa (MetY) [EC 2.5.1.49] es la conversión de O-acetil-L-homoserina con metanotiol (MC) en presencia de piridoxal-5'-fosfato (PLP) para dar L-metionina y acetato. Tal como se describe en el ejemplo 2a, el progreso de esta reacción puede determinarse por medio de mediciones de absorción de DTNB a 412 nm, dado que DTNB reacciona con el grupo SH de metilmercaptano sin reaccionar para dar una sustancia amarilla. Para este fin, las dos cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se prepararon como homogeneizados celulares tal como se ha descrito anteriormente y la disminución o la conversión del sustrato metilmercapturo de sodio se midió en el ensayo enzimático subsiguiente.

Cada preparación se realizó a 37 °C en una mezcla de reacción de 1 ml con tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,5), metilmercapturo de sodio (NaMC) 2 mM [10 μ l de una solución madre de NaMC 200 mM], OAH HCl 3 mM [30 μ l de una solución madre de OAH HCl 100 mM] y PLP 0,01 mM [10 μ l de una solución madre de PLP 1 mM] con el homogeneizado celular respectivo a una concentración de proteína total de 0,012 g/l; 0,024 g/l, o 0,048 g/l. Después de la reacción enzimática de tiempo limitado, se realizó la medición fotométrica del contenido de NaMC por medio de DTNB, llevándose a cabo previamente una calibración utilizando concentraciones de MC de entre 0 y 200 μ M. Para este fin, se añadieron 180 μ l de una solución de DTNB (4 mg/ml) a cada 20 μ l de la mezcla de reacción enzimática y subsiguientemente se midió a 412 nm.

La presencia del homogeneizado celular de la cepa MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY conduce a la disminución del NaMC, que está catalizada de forma significativamente más rápida que en presencia del homogeneizado celular de MG1655/pMW218, debido a la actividad enzimática de MetY, que depende de la concentración total de proteína (figura 4). La disminución de NaMC que también tiene lugar, pero más débilmente, en las preparaciones con el homogeneizado celular de MG1655/pMW218 es independiente de la cantidad de proteína utilizada. También se pudo observar una disminución idéntica en una preparación sin homogeneizado celular, y esto se debe a la desgasificación químicamente dependiente del metilmercaptano que se produce a partir de las soluciones. A partir de la diferencia en las pendientes en el intervalo lineal, se puede calcular una actividad específica de sulfhidrilasa de MetY de alrededor de 1500 unidades por g de proteína total (1 unidad = 1 μ mol de conversión de sustrato/min), que se encuentra en el mismo nivel que la de la enzima MetX.

3) Detección de la biotransformación celular de L-homoserina y metilmercapturo de sodio para dar L-metionina

Las cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se cultivaron tal como se describe en el ejemplo 1 y después, en la fase exponencial de cada preparación, se ajustaron a una DO600 de alrededor de 7.

5 La biotransformación se llevó a cabo en matraces de 100 ml con agitación a 37 °C, 200 rpm, durante un período de tiempo de 0, 2, 4 y 24 h. Cada preparación se realizó en 10 ml de medio A con 6,5 g/l de L-homoserina [500 µl de una solución madre de homoserina de 100 g/l] (Sigma Aldrich, Alemania), 3 g/l de NaMC [500 µl de una solución madre de NaMC al 6%] y 12 g/l KH₂PO₄ [600 µl de una solución madre de 200 g/l de KH₂PO₄].

10 La conversión de L-homoserina con metilmercaptano para dar L-metionina se realizó utilizando la cepa MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY, mientras que no se sintetizó L-metionina utilizando la cepa MG1655/pMW218 (tabla 1). Los diversos rendimientos basados en las cantidades de NaMC cargadas inicialmente y las cantidades de L-homoserina consumidas se basan en una estequiometría igual de ambos sustratos presentes al inicio, pero considerando la evaporación subsiguiente que tiene lugar de forma natural del metilmercaptano.

15 Tabla 1: Comparación de las biotransformaciones de 6,5 g/l de L-homoserina sintética y 3 g/l de metilmercaptano de sodio utilizando las cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY. Se muestran el título de L-metionina obtenido a lo largo del transcurso tiempo y los rendimientos relacionados en base a la cantidad de NaMC pulsada al inicio y la cantidad de L-homoserina (L-HS) consumida.

20

MG1655/pMW218	0 h	2 h	4 h	24 h
L-Met (g/l)	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005

MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY	0 h	2 h	4 h	24 h
L-Met (g/l)	<0,005	0,810	0,980	1,500
L-Homoserina (g/l)	6,580	4,220	4,020	3,560
L-Met/NaMC cargado inicialmente (mol/mol)	0%	12,7%	15,3%	23,5%
L-Met/L-HS consumida (mol/mol)	0%	27,4%	30,6%	39,7%

Además, se llevó a cabo una biotransformación utilizando la cepa MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY en la que se utilizó NaMC deuterado (D₃CSNa) en lugar de la solución madre de NaMC de Sigma Aldrich. Este se preparó introduciendo CD₃SD (Sigma-Aldrich, 98% en átomos de D) en una cantidad equimolar de solución acuosa de hidróxido de sodio. (Alternativamente, se puede preparar según J. Voss *et al.*, Phosphorous, Sulfur and Silicon and the Related Elements, 2012, 187, 382 a partir de tiourea y CD₃I). El análisis de la solución después de 24 h de reacción por CL-EM mostró una relación de metionina con respecto a metionina-d-3 de 1:200. Pudo detectarse, por lo tanto, que la metionina formada en la biotransformación se forma exclusivamente mediante la incorporación de metilmercaptano suministrado externamente.

30

4) Conversión de L-homoserina, producida por fermentación, en L-metionina mediante una biotransformación

Sobre la base de la biotransformación de L-homoserina sintética a L-metionina realizada en el ejemplo 3a, también se investigó la biotransformación de L-homoserina producida por fermentación. La concentración del caldo de L-homoserina producido por fermentación fue de 10 g/l. La cepa MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se cultivó como en el ejemplo 1 y la biotransformación se llevó a cabo en la fase exponencial a una DO de 5 en presencia de 5 g/l de L-homoserina producida por fermentación y tal como se describe en el ejemplo 3a durante 2, 4 y 24 h. Tal como se muestra en la tabla 2, después de dos horas de biotransformación alrededor del 7%, después de cuatro horas alrededor del 12% y después de 24 horas alrededor del 45% de los sustratos L-homoserina o NaMC se convirtieron en L-metionina, lo que se reflejó en un título máximo de alrededor de 2,9 g/l de L-metionina.

40

Tabla 2: L-metionina y los rendimientos relacionados formados por la biotransformación de 5 g/l de L-homoserina producida por fermentación y 3 g/l de metilmercaptano de sodio por la cepa MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY.

Tiempo (h)	0	2	4	24
L-Met (g/l)	<0,005	0,45	0,79	2,87
L-Homoserina a partir de fermentación (g/l)	5,26	4,74	4,24	2,15
L-Met/NaMC cargado inicialmente (mol/mol)	0%	7%	12%	45%
L-Met/L-HS consumida (mol/mol)	0%	69%	62%	74%

5) Reciclaje celular de acetato durante la biotransformación

- 5 Para investigar las cantidades de acetato formadas en la biotransformación de L-homoserina y metilmercaptano, se documentaron preparaciones utilizando las cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY en presencia de 5 g/l de L-homoserina y 3 g/l de metilmercaptano de sodio y 12 g/l KH_2PO_4 [600 μl de solución madre de 200 g/l de KH_2PO_4] durante cuatro horas con respecto a su contenido de acetato.
- 10 Las cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se prepararon tal como se describe en el ejemplo 1, de forma que se utilizó un cultivo exponencial que tenía una DO inicial de alrededor de 3 para las preparaciones de 10 ml respectivas en matraces de 100 ml tal como se describe en el ejemplo 3b.
- 15 Las concentraciones de acetato que se forman durante la biotransformación de 5 g/l de L-homoserina y 3 g/l de metilmercaptano de sodio por las cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se documentan en la tabla 3. Se forma L-metionina solo en la preparación con la cepa que expresa heterológicamente los genes *metX* y *metY*, mientras que en la preparación con la cepa de control MG1655/pMW218 no se detectó L-metionina.
- 20 Dentro de las primeras cuatro horas se forman alrededor de 11 mM de acetato debido a los parámetros experimentales en la preparación de control, mientras que en la biotransformación se forman alrededor de 17 mM de acetato y 7 mM de L-metionina. El exceso de acetato medido en la preparación de biotransformación que da lugar a la diferencia es, por lo tanto, de 6 mM. Debido a la síntesis adicional de metionina con una producción equimolar de acetato y metionina, que no se describe para sistemas no celulares (documento WO 2008/013432 A1), este valor sería de 7 mM. Por lo tanto, se pudo detectar un reciclaje celular del acetato formado en la síntesis de L-metionina en la biotransformación. El acetato adicional resultante de la biotransformación, por lo tanto, obviamente se ha reciclado parcialmente por la acetil-CoA sintetasa (Acs) dando acetil-CoA.
- 25

- 30 Tabla 3: Formación y reciclaje de acetato en preparaciones de biotransformación con las cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY en presencia de 5 g/l de L-homoserina y 3 g/l de metilmercaptano de sodio.

Tiempo [h]	MG1655/pMW_Ptac-metX_Ptac-metY L-Met [mM]	MG1655/pMW_Ptac-metX_Ptac-metY Acetato [mM]	MG1655/pMW218 Acetato [mM]	Exceso de acetato [mM]	Cantidad de acetato esperada (equimolar con respecto a L-Met) [mM]	Acetato reciclado [mM]
0	<0,03	<0,08	<0,08	0,00	0,00	0,00
2	4,76	10,29	7,54	2,75	4,76	2,01
4	7,37	17,45	11,22	6,22	7,37	1,15

6) Adición externa de L-homoserina

- 35 Las cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se prepararon tal como se describe en el ejemplo 1, de forma que se utilizó un cultivo exponencial con una DO inicial de alrededor de 3 para las preparaciones de 10 ml respectivas en matraces de 100 ml tal como se describe en el ejemplo 3b. Las preparaciones respectivas vinieron seguidas en el punto temporal de 0 h en primer lugar de ninguna adición, de la adición de 5 g/l de L-homoserina, de la adición de 3 g/l de metilmercaptano de sodio con 12 g/l de KH_2PO_4 [600 μl de solución madre de 200 g/l de KH_2PO_4] y de la adición de 5 g/l de L-homoserina con 3 g/l de metilmercaptano de sodio y 12 g/l de KH_2PO_4 [600 μl de solución madre de 200 g/l de KH_2PO_4].
- 40

Los títulos de L-metionina y L-homoserina de las preparaciones se determinaron en los puntos temporales 0, 2, 4 y 6 h.

- 5 Tabla 4: Títulos de L-metionina y L-homoserina después de la adición externa de 5 g/l de L-homoserina (L-HS) a las preparaciones de biotransformación utilizando las cepas MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY en presencia y ausencia de 3 g/l de metilmercapturo de sodio (Na-MC).

			MG1655/pMW_Ptac-metX_Ptac-metY		MG1655/pMW218	
Tiempo [h]	Adición de L-HS	Adición de Na-MC	L-metionina [g/l]	L-homoserina [g/l]	L-metionina [g/l]	L-homoserina [g/l]
0	-	-	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
2	-	-	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
4	-	-	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
6	-	-	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
24	-	-	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
0	5 g/l	-	<0,005	5,38	<0,005	5,34
2	-	-	<0,005	4,09	<0,005	5,08
4	-	-	<0,005	2,35	<0,005	4,77
6	-	-	<0,005	1,51	<0,005	4,46
24	-	-	<0,005	<0,005	<0,005	3,52
0	-	3 g/l	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
2	-	-	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
4	-	-	0,22	<0,005	<0,005	<0,005
6	-	-	0,27	<0,005	<0,005	<0,005
24	-	-	0,28	<0,005	<0,005	<0,005
0	5 g/l	3 g/l	<0,005	5,01	<0,005	5,31
2			0,71	4,44	<0,005	5,09
4			1,10	4,11	<0,005	4,89
6			1,24	4,06	<0,005	4,65
24			1,46	3,56	<0,005	3,98

- 10 7) Biotransformación de L-homoserina y disulfuro de dimetilo (DMDS) o de L-homoserina y metilmercapturo de sodio (NaMC) para dar L-metionina

La cepa MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se cultivó tal como se describe en el ejemplo 1 y a continuación, en la fase exponencial de cada preparación, se ajustó a una DO600 de alrededor de 10.

- 15 La biotransformación se llevó a cabo en matraces con agitación de 100 ml a 37 °C, 200 rpm, durante un período de tiempo de 0, 24 y 48 h. Cada preparación se realizó en 10 ml de medio A (véase el ejemplo 1) con 5,0 g/l de L-homoserina y 12 g/l de KH₂PO₄ [600 µl de una solución madre de 200 g/l de KH₂PO₄] y las cantidades de la fuente de azufre (es decir, NaMC o DMDS) tal como se proporcionan en la tabla 5. El control no contenía ninguna fuente de azufre (es decir, ni NaMC ni DMDS).
- 20

Tabla 5: Comparación de los resultados de la biotransformación con NaMC, control (sin fuente de azufre) y DMDS a diferentes concentraciones y períodos de tiempo de reacción

ES 2 748 226 T3

Concentración de fuente de azufre, tiempo de reacción	L-homoserina [g/l]	L-metionina [g/l]	O-acetil-L-homoserina [g/l]
1,0 g/l de NaMC, 24 h	3,52	1,64	<0,005
Control, 0 h	4,9	<0,005	<0,005
Control, 24 h	1,48	<0,005	3,74
0,5 g/l de DMDS, 24 h	2,3	0,2	2,82
1 g/l de DMDS, 24 h	2,48	0,32	2,34
1 g/l de DMDS, 48 h	2,52	0,46	2,06
2 g/l de DMDS, 24 h	3,3	0,42	1,38

ES 2 748 226 T3

ggt ggt gcc cgc acc cta gag tgg gcc gca atg tac cca gaa act gtt 480
 Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160
 ggc gca gct gct gtt ctt gca gtt tct gca cgc gcc agc gcc tgg caa 528
 Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175
 atc ggc att caa tcc gcc caa att aag gcg att gaa aac gac cac cac 576
 Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190
 tgg cac gaa ggc aac tac tac gaa tcc gcc tgc aac cca gcc acc gga 624
 Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Gln Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205
 ctc ggc gcc gcc cga cgc atc gcc cac ctc acc tac cgt gcc gaa cta 672
 Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220
 gaa atc gac gaa cgc ttc ggc acc aaa gcc caa aag aac gaa aac cca 720
 Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 ctc ggt ccc tac cgc aag ccc gac cag cgc ttc gcc gtg gaa tcc tac 768
 Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255
 ttg gac tac caa gca gac aag cta gta cag cgt ttc gac gcc ggc tcc 816
 Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270
 tac gtc ttg ctc acc gac gcc ctc aac cgc cac gac att ggt cgc gac 864
 Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285
 cgc gga ggc ctc aac aag gca ctc gaa tcc atc aaa gtt cca gtc ctt 912
 Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 gtc gca ggc gta gat acc gat att ttg tac ccc tac cac cag caa gaa 960
 Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Leu Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320
 cac ctc tcc aga aac ctg gga aat cta ctg gca atg gca aaa atc gta 1008
 His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335
 tcc cct gtc ggc cac gat gct ttc ctc acc gaa agc cgc caa atg gat 1056
 Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350
 cgc atc gtg agg aac ttc ttc agc ctc atc tcc cca gac gaa gac aac 1104
 Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365
 cct tcg acc tac atc gag ttc tac atc taa tag 1137
 Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 2

<211> 377

5

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

ES 2 748 226 T3

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

Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala
 20 25 30

Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn
 35 40 45

Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp
 50 55 60

Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile
 65 70 75 80

Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr
 85 90 95

Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe
 100 105 110

Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu
 115 120 125

Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Leu Gly Gly Ser Met
 130 135 140

Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu Thr Val
 145 150 155 160

Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala Trp Gln
 165 170 175

Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp His His
 180 185 190

Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala Thr Gly
 195 200 205

Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Leu
 210 215 220

Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu Asn Pro
 225 230 235 240

ES 2 748 226 T3

Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu Ser Tyr
 245 250 255

Leu Asp Tyr Gln Ala Asp Lys Leu Val Gln Arg Phe Asp Ala Gly Ser
 260 265 270

Tyr Val Leu Leu Thr Asp Ala Leu Asn Arg His Asp Ile Gly Arg Asp
 275 280 285

Arg Gly Gly Leu Asn Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300

Val Ala Gly Val Asp Thr Asp Ile Leu Tyr Pro Tyr His Gln Gln Glu
 305 310 315 320

His Leu Ser Arg Asn Leu Gly Asn Leu Leu Ala Met Ala Lys Ile Val
 325 330 335

Ser Pro Val Gly His Asp Ala Phe Leu Thr Glu Ser Arg Gln Met Asp
 340 345 350

Arg Ile Val Arg Asn Phe Phe Ser Leu Ile Ser Pro Asp Glu Asp Asn
 355 360 365

Pro Ser Thr Tyr Ile Glu Phe Tyr Ile
 370 375

<210> 3

<211> 1314

5 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1314)

<223> metY

<400> 3

atg cca aag tac gac aat tcc aat gct gac cag tgg ggc ttt gaa acc 48
 Met Pro Lys Tyr Asp Asn Ser Asn Ala Asp Gln Trp Gly Phe Glu Thr
 1 5 10 15

cgc tcc att cac gca ggc cag tca gta gac gca cag acc agc gca cga 96
 Arg Ser Ile His Ala Gly Gln Ser Val Asp Ala Gln Thr Ser Ala Arg
 20 25 30

aac ctt ccg atc tac caa tcc acc gct ttc gtg ttc gac tcc gct gag 144
 Asn Leu Pro Ile Tyr Gln Ser Thr Ala Phe Val Phe Asp Ser Ala Glu
 35 40 45

15 cac gcc aag cag cgt ttc gca ctt gag gat cta ggc cct gtt tac tcc 192

ES 2 748 226 T3

His	Ala	Lys	Gln	Arg	Phe	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Pro	Val	Tyr	Ser		
50						55					60						
cgc	ctc	acc	aac	cca	acc	ggt	gag	gct	ttg	gaa	aac	cgc	atc	gct	tcc		240
Arg	Leu	Thr	Asn	Pro	Thr	Val	Glu	Ala	Leu	Glu	Asn	Arg	Ile	Ala	Ser		
65					70					75					80		
ctc	gaa	ggt	ggc	gtc	cac	gct	gta	gcg	ttc	tcc	tcc	gga	cag	gcc	gca		288
Leu	Glu	Gly	Gly	Val	His	Ala	Val	Ala	Phe	Ser	Ser	Gly	Gln	Ala	Ala		
				85					90					95			
acc	acc	aac	gcc	att	ttg	aac	ctg	gca	gga	gcg	ggc	gac	cac	atc	gtc		336
Thr	Thr	Asn	Ala	Ile	Leu	Asn	Leu	Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	His	Ile	Val		
			100					105					110				
acc	tcc	cca	cgc	ctc	tac	ggt	ggc	acc	gag	act	cta	ttc	ctt	atc	act		384
Thr	Ser	Pro	Arg	Leu	Tyr	Gly	Gly	Thr	Glu	Thr	Leu	Phe	Leu	Ile	Thr		
		115					120					125					
ctt	aac	cgc	ctg	ggt	atc	gat	ggt	tcc	ttc	gtg	gaa	aac	ccc	gac	gac		432
Leu	Asn	Arg	Leu	Gly	Ile	Asp	Val	Ser	Phe	Val	Glu	Asn	Pro	Asp	Asp		
	130					135					140						
cct	gag	tcc	tgg	cag	gca	gcc	ggt	cag	cca	aac	acc	aaa	gca	ttc	ttc		480
Pro	Glu	Ser	Trp	Gln	Ala	Ala	Val	Gln	Pro	Asn	Thr	Lys	Ala	Phe	Phe		
145				150						155				160			
ggc	gag	act	ttc	gcc	aac	cca	cag	gca	gac	gtc	ctg	gat	att	cct	gcg		528
Gly	Glu	Thr	Phe	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Asp	Val	Leu	Asp	Ile	Pro	Ala		
				165					170					175			
gtg	gct	gaa	ggt	gcg	cac	cgc	aac	agc	ggt	cca	ctg	atc	atc	gac	aac		576
Val	Ala	Glu	Val	Ala	His	Arg	Asn	Ser	Val	Pro	Leu	Ile	Ile	Asp	Asn		
			180					185						190			
acc	atc	gct	acc	gca	gcg	ctc	gtg	cgc	ccg	ctc	gag	ctc	ggc	gca	gac		624
Thr	Ile	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Val	Arg	Pro	Leu	Glu	Leu	Gly	Ala	Asp		
		195					200					205					
ggt	gtc	gtc	gct	tcc	ctc	acc	aag	ttc	tac	acc	ggc	aac	ggc	tcc	gga		672
Val	Val	Val	Ala	Ser	Leu	Thr	Lys	Phe	Tyr	Thr	Gly	Asn	Gly	Ser	Gly		
	210					215					220						
ctg	ggc	ggc	gtg	ctt	atc	gac	ggc	gga	aag	ttc	gat	tgg	act	gtc	gaa		720
Leu	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Gly	Lys	Phe	Asp	Trp	Thr	Val	Glu		
	225				230					235				240			
aag	gat	gga	aag	cca	gta	ttc	ccc	tac	ttc	gtc	act	cca	gat	gct	gct		768
Lys	Asp	Gly	Lys	Pro	Val	Phe	Pro	Tyr	Phe	Val	Thr	Pro	Asp	Ala	Ala		
				245					250					255			
tac	cac	gga	ttg	aag	tac	gca	gac	ctt	ggt	gca	cca	gcc	ttc	ggc	ctc		816
Tyr	His	Gly	Leu	Lys	Tyr	Ala	Asp	Leu	Gly	Ala	Pro	Ala	Phe	Gly	Leu		
			260					265					270				
aag	ggt	cgc	ggt	ggc	ctt	cta	cgc	gac	acc	ggc	tcc	acc	ctc	tcc	gca		864
Lys	Val	Arg	Val	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Thr	Gly	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala		
		275						280				285					
ttc	aac	gca	tgg	gct	gca	gtc	cag	ggc	atc	gac	acc	ctt	tcc	ctg	cgc		912
Phe	Asn	Ala	Trp	Ala	Ala	Val	Gln	Gly	Ile	Asp	Thr	Leu	Ser	Leu	Arg		
	290					295					300						

ES 2 748 226 T3

ctg gag cgc cac aac gaa aac gcc atc aag gtt gca gaa ttc ctc aac 960
 Leu Glu Arg His Asn Glu Asn Ala Ile Lys Val Ala Glu Phe Leu Asn
 305 310 315 320

aac cac gag aag gtg gaa aag gtt aac ttc gca gcc ctg aag gat tcc 1008
 Asn His Glu Lys Val Glu Lys Val Asn Phe Ala Gly Leu Lys Asp Ser
 325 330 335

cct tgg tac gca acc aag gaa aag ctt ggc ctg aag tac acc ggc tcc 1056
 Pro Trp Tyr Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Thr Gly Ser
 340 345 350

gtt ctc acc ttc gag atc aag ggc gcc aag gat gag gct tgg gca ttt 1104
 Val Leu Thr Phe Glu Ile Lys Gly Gly Lys Asp Glu Ala Trp Ala Phe
 355 360 365

atc gac gcc ctg aag cta cac tcc aac ctt gca aac atc ggc gat gtt 1152
 Ile Asp Ala Leu Lys Leu His Ser Asn Leu Ala Asn Ile Gly Asp Val
 370 375 380

cgc tcc ctc gtt gtt cac cca gca acc acc acc cat tca cag tcc gac 1200
 Arg Ser Leu Val Val His Pro Ala Thr Thr Thr His Ser Gln Ser Asp
 385 390 395 400

gaa gct ggc ctg gca cgc gcg ggc gtt acc cag tcc acc gtc cgc ctg 1248
 Glu Ala Gly Leu Ala Arg Ala Gly Val Thr Gln Ser Thr Val Arg Leu
 405 410 415

tcc gtt ggc atc gag acc att gat gat atc atc gct gac ctc gaa ggc 1296
 Ser Val Gly Ile Glu Thr Ile Asp Asp Ile Ile Ala Asp Leu Glu Gly
 420 425 430

ggc ttt gct gca atc tag 1314
 Gly Phe Ala Ala Ile
 435

<210> 4

<211> 437

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4

Met Pro Lys Tyr Asp Asn Ser Asn Ala Asp Gln Trp Gly Phe Glu Thr
 1 5 10 15

Arg Ser Ile His Ala Gly Gln Ser Val Asp Ala Gln Thr Ser Ala Arg
 20 25 30

Asn Leu Pro Ile Tyr Gln Ser Thr Ala Phe Val Phe Asp Ser Ala Glu
 35 40 45

His Ala Lys Gln Arg Phe Ala Leu Glu Asp Leu Gly Pro Val Tyr Ser
 50 55 60

Arg Leu Thr Asn Pro Thr Val Glu Ala Leu Glu Asn Arg Ile Ala Ser
 65 70 75 80

10

ES 2 748 226 T3

Leu Glu Gly Gly Val His Ala Val Ala Phe Ser Ser Gly Gln Ala Ala
 85 90 95
 Thr Thr Asn Ala Ile Leu Asn Leu Ala Gly Ala Gly Asp His Ile Val
 100 105 110
 Thr Ser Pro Arg Leu Tyr Gly Gly Thr Glu Thr Leu Phe Leu Ile Thr
 115 120 125
 Leu Asn Arg Leu Gly Ile Asp Val Ser Phe Val Glu Asn Pro Asp Asp
 130 135 140
 Pro Glu Ser Trp Gln Ala Ala Val Gln Pro Asn Thr Lys Ala Phe Phe
 145 155 160
 Gly Glu Thr Phe Ala Asn Pro Gln Ala Asp Val Leu Asp Ile Pro Ala
 165 170 175
 Val Ala Glu Val Ala His Arg Asn Ser Val Pro Leu Ile Ile Asp Asn
 180 185 190
 Thr Ile Ala Thr Ala Ala Leu Val Arg Pro Leu Glu Leu Gly Ala Asp
 195 200 205
 Val Val Val Ala Ser Leu Thr Lys Phe Tyr Thr Gly Asn Gly Ser Gly
 210 215 220
 Leu Gly Gly Val Leu Ile Asp Gly Gly Lys Phe Asp Trp Thr Val Glu
 225 230 235 240
 Lys Asp Gly Lys Pro Val Phe Pro Tyr Phe Val Thr Pro Asp Ala Ala
 245 250 255
 Tyr His Gly Leu Lys Tyr Ala Asp Leu Gly Ala Pro Ala Phe Gly Leu
 260 265 270
 Lys Val Arg Val Gly Leu Leu Arg Asp Thr Gly Ser Thr Leu Ser Ala
 275 280 285
 Phe Asn Ala Trp Ala Ala Val Gln Gly Ile Asp Thr Leu Ser Leu Arg
 290 295 300
 Leu Glu Arg His Asn Glu Asn Ala Ile Lys Val Ala Glu Phe Leu Asn
 305 310 315 320
 Asn His Glu Lys Val Glu Lys Val Asn Phe Ala Gly Leu Lys Asp Ser
 325 330 335

ES 2 748 226 T3

Pro Trp Tyr Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Thr Gly Ser
 340 345 350

Val Leu Thr Phe Glu Ile Lys Gly Gly Lys Asp Glu Ala Trp Ala Phe
 355 360 365

Ile Asp Ala Leu Lys Leu His Ser Asn Leu Ala Asn Ile Gly Asp Val
 370 375 380

Arg Ser Leu Val Val His Pro Ala Thr Thr Thr His Ser Gln Ser Asp
 385 390 395 400

Glu Ala Gly Leu Ala Arg Ala Gly Val Thr Gln Ser Thr Val Arg Leu
 405 410 415

Ser Val Gly Ile Glu Thr Ile Asp Asp Ile Ile Ala Asp Leu Glu Gly
 420 425 430

Gly Phe Ala Ala Ile
 435

<210> 5
 <211> 41
 5 <212> ADN
 <213> Promotor híbrido

<220>
 <221> promotor
 10 <222> (1)..(41)
 <223> Ptacl

<400> 5

15 gagctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg a 41

<210> 6
 <211> 3255
 <212> ADN
 20 <213> secuencia sintetizada

<400> 6

cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata	60
tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg	120
accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat	180
gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta togccgctcc cgattcgag cgcacgcct	240
tctatcgct tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg ggttcggca cacagcccag	300
cttgagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc	360

25

ES 2 748 226 T3

ccaatacgc aaccgcctct ccccgcgct tggccgattc attatggagc tgttgacaat 420
 taatcatcgg ctctgataat gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac 480
 agaattcaaa ggagagacaac catgcccacc ctcgcgctt caggtcaact tgaatccaa 540
 gcgatcgggt atgtctccac cgaagccgga gcaatcatta caaacgctga aatcgcctat 600
 caccgctggg gtgaataccg cgtagataaa gaaggacgca gcaatgtcgt tctcatcgaa 660
 cacgccctca ctggagattc caacgcagcc gattggtggg ctgacttgcg cggccccggc 720
 aaagccatca aactgatata ttactcgtg atctgtacca acgtcatcgg tggttgcaac 780
 ggttccaccg gacctggctc catgcatcca gatggaatt tctggggtaa tcgcttcccc 840
 gccacgtcca ttctgatca ggtaaaccgc gaaaaacaat tcctcgacgc actcggcatc 900
 accacggctc cgcagctact tgggtggtcc atgggtggg cccgcaccct agagtgggcc 960
 gcaatgtacc cagaaactgt tggcgcagct gctgttcttg cagtttctgc acgcgccagc 1020
 gcctggcaaa tcggcattca atccgcccc attaaggoga ttgaaaaaga ccaccaactgg 1080
 cacgaaggca actactacga atccgctgc aaccagcca ccggactcgg cgcgcgccga 1140
 cgcacgcgcc acctcaccta ccgtggcgaa ctagaaatcg acgaacgctt cggcaccaaa 1200
 gcccaaaaga acgaaaacc actcgtccc taccgcaagc ccgaccagcg cttcgcctg 1260
 gaatcctact tggactacca agcagacaag ctagtacagc gtttcgacgc cggctcctac 1320
 gtcttgcctc ccgacgcct caaccgccac gacattggtc gcgaccgagg aggcctcaac 1380
 aaggcactcg aatccatcaa agttccagtc cttgtcgcag gcgtagatac cgatattttg 1440
 taccctacc accgcaaga acacctctc agaaacctgg gaaatctact ggcaatggca 1500
 aaaatcgtat cccctgctcg ccacgatgct ttctcaccg aaagccgcca aatggatcgc 1560
 atcgtgagga acttcttcag cctcatctcc ccagacgaag acaaccctc gacctacac 1620
 gagttctaca tctaataagac gcgtgagctg ttgacaatta atcatcggct cgtataatgt 1680
 gtggaattgt gagcggataa caatttcacg cgtttaatta acacgagtac tggaaaacta 1740
 aatgccaaag tacgacaatt ccaatgctga ccagtggggc tttgaaacc gctccattca 1800
 cgcaggccag tcagtagacg cacagaccag cgcacgaaac cttccgatct accaatccac 1860
 cgctttcgtg ttcgaactccg ctgagcacgc caagcagcgt ttcgcacttg aggatctagg 1920
 cctgtttac tcccgcctca ccaaccacac cgttgaggct ttggaaaacc gcatcgettc 1980
 cctcgaagggt ggcgtccacg ctgtagcgtt ctctccgga caggccgcaa ccaccaacgc 2040
 catttgaaac ctggcaggag cgggcgacca catcgtcacc tcccacgcc tctacggtgg 2100
 caccgagact ctattcctta tcaactetta ccgcctgggt atcgatggtt ccttcgtgga 2160
 aaaccccgac gacctgagt cctggcaggc agccgttcag ccaaaccaca aagcattctt 2220
 cggcgagact ttgcacaacc cacaggcaga cgtcctggat attcctgagg tggctgaagt 2280

ES 2 748 226 T3

tgcgaccgc aacagcgttc cactgatcat cgacaacacc atcgctaccg cagcgctcgt	2340
gcgcccgctc gagctcggcg cagacgttgt cgtcgttcc ctcaccaagt tctacaccgg	2400
caacggctcc ggactgggcg gcgtgcttat cgacggcggg aagttcgatt ggactgtcga	2460
aaaggatgga aagccagtat tcccctactt cgtcactcca gatgctgctt accacggatt	2520
gaagtacgca gaccttggcg caccagcctt cggcctcaag gttcgcggtg gccttctacg	2580
cgacaccggc tccaccctct ccgcattcaa cgcattgggt gcagtccagg gcacgcacac	2640
cctttcctg cgctggagc gccacaacga aaacgccatc aaggttgag aattcctcaa	2700
caaccacgag aaggtgaaa aggttaactt cgcaggcctg aaggattccc cttggtacgc	2760
aaccaaggaa aagcttggcc tgaagtacac cggctccgtt ctcaccttcg agatcaaggg	2820
cggcaaggat gaggcttggg catttatcga cgccctgaag ctacactcca accttgcaaa	2880
catcggcgat gttcgtccc tcgtgttca cccagcaacc accaccatt cacagtccga	2940
cgaagctggc ctggcacgcg cgggcgttac ccagtccacc gtccgcctgt ccgttggcat	3000
cgagaccatt gatgatatca tcgctgacct cgaaggcggc ttgctgcaa tctagggccg	3060
gccgtttaa cctgcaggt ccgggacctg caggcatgca agcttggcac tggccgctgt	3120
tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttaccaa cttaatcgcc ttgcagcaca	3180
tcccccttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttccaaca	3240
gttgcgcagc ctgaa	3255

201500228 A 2

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para producir L-metionina, en el que un microorganismo que tiene actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa y actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa se cultiva en un medio de cultivo que comprende L-homoserina y una fuente de azufre, seleccionada del grupo que consiste en metilmercaptano, una sal de metilmercaptano y disulfuro de dimetilo, mediante el que se acumula L-metionina en el medio de cultivo.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es recombinante y se potencian la actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa y la actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa y la actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa se potencian ambas mediante el aumento de expresión de un gen que codifica una proteína que tiene actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa o una proteína que tiene actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el aumento de la expresión génica se efectúa aumentando el número de copias del gen que codifica la proteína que tiene actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa y/o la proteína que tiene actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 3 o 4, en el que el aumento de la expresión génica se efectúa mediante el enlace funcional del gen que codifica la proteína que tiene actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa y/o la proteína que tiene actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa a un promotor fuerte.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Enterobacteriaceae* y *Corynebacteriaceae*.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la actividad de L-homoserina O-acetiltransferasa es la enzima MetX, que se origina a partir de *Corynebacterium glutamicum*.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la actividad de O-acetil-L-homoserina sulfhidrilasa es la enzima MetY, que se origina a partir de *Corynebacterium glutamicum*.

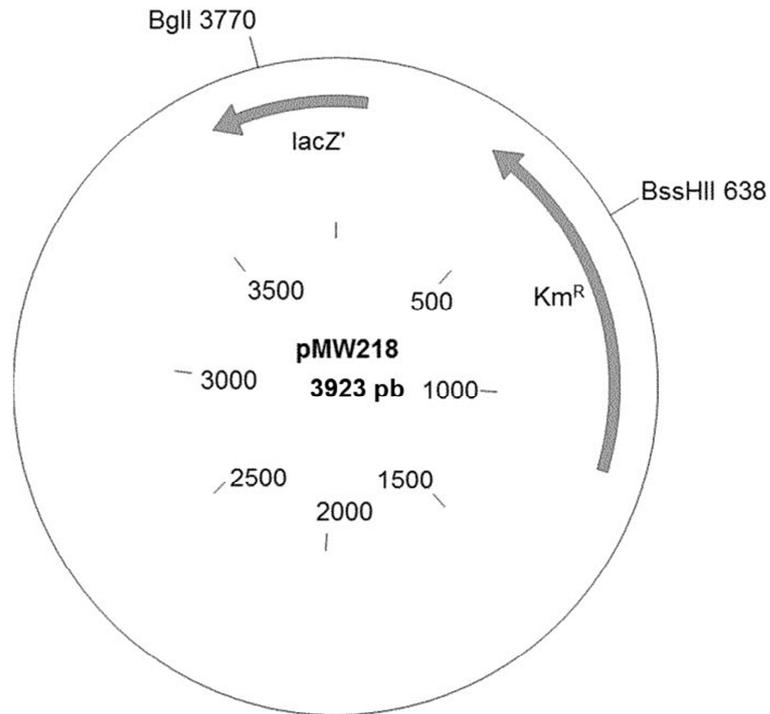


Figura 1: mapa del plásmido pMW218

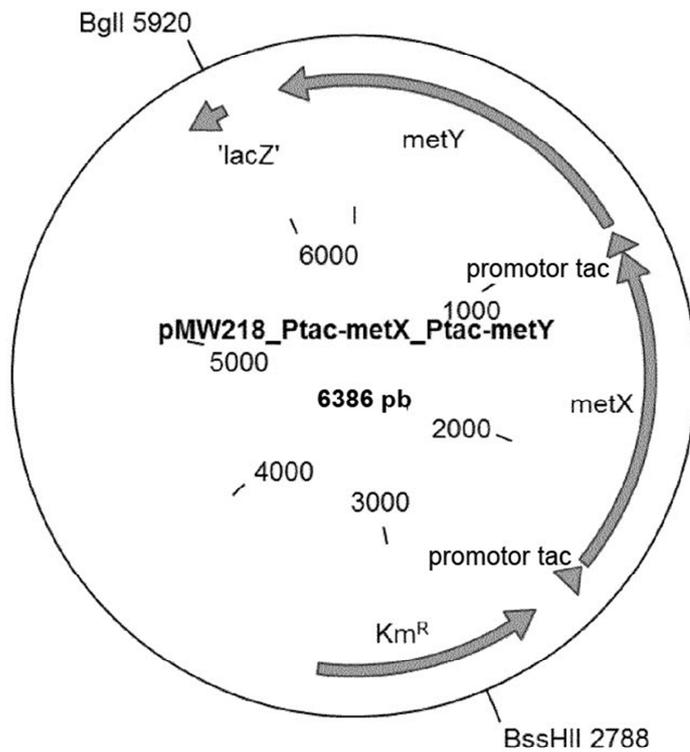


Figura 2: mapa del plásmido pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY

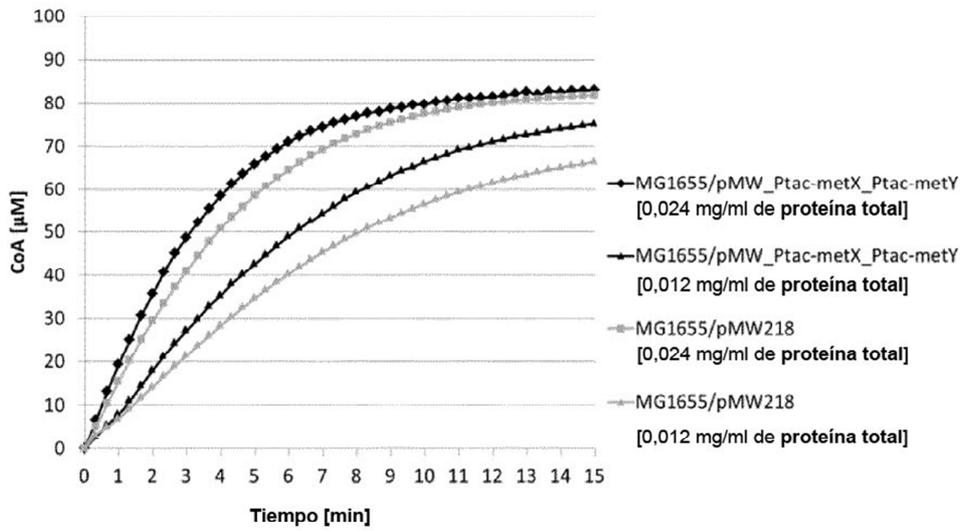


Figura 3: Conversión catalítica de L-homoserina y acetil-CoA por los homogeneizados celulares de MG1655/pMW218 o MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY.

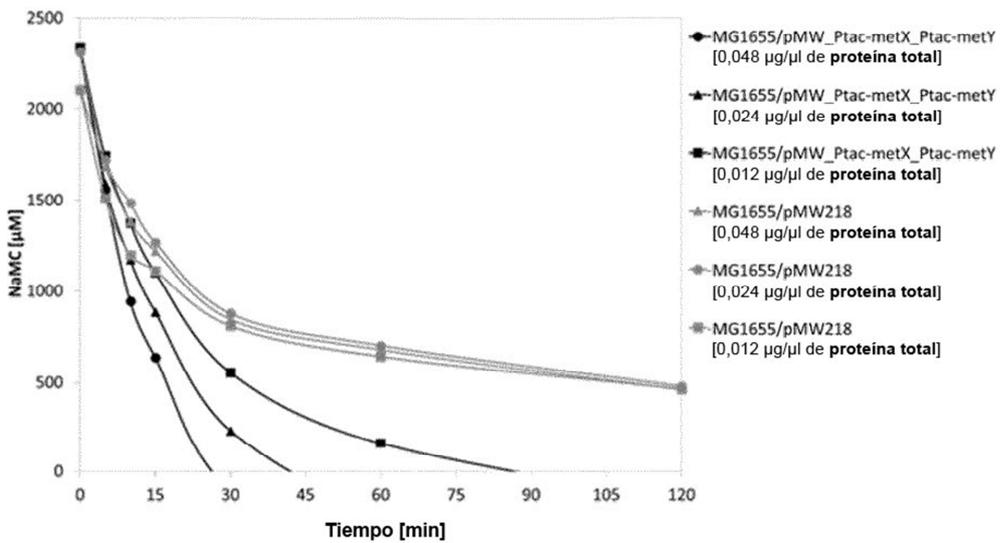


Figura 4: Conversión catalítica de metilmercapturo de sodio en presencia de O-acetilhomoserina y piridoxal-5'-fosfato (PLP) por la enzima O-acetilhomoserina sulfhidrasa (MetY). La comparación de los homogeneizados celulares de MG1655/pMW218 y MG1655/pMW218_Ptac-metX_Ptac-metY se muestra con las respectivas concentraciones de proteína total utilizadas