

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 589**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012 PCT/EP2012/062674**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13001055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12730555 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2726626**

54 Título: **Un microorganismo para la producción de metionina con importación de glucosa mejorada**

30 Prioridad:

29.06.2011 EP 11305829
29.06.2011 US 201161502528 P

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

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DISCHERT, WANDA y
FIGGE, RAINER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 654 589 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

Un microorganismo para la producción de metionina con importación de glucosa mejorada.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un microorganismo mejorado para la producción de metionina y al procedimiento para la preparación de metionina. En particular, la presente invención se refiere a un microorganismo para la producción de metionina con importación de glucosa mejorada que comprende la sobreexpresión del gen *ptsG* y eliminación del gen *dgsA*, en donde la expresión de al menos uno de los siguientes genes está atenuada: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *yncA* o *udhA*.

Técnica anterior

- 10 Los compuestos que contienen azufre tales como la cisteína, homocisteína, metionina o S-adenosilmetionina son críticos para el metabolismo celular y se pueden producir industrialmente para usar como aditivos de alimentos o piensos y productos farmacéuticos. En particular la metionina, un aminoácido esencial, que no puede ser sintetizado por animales, tiene una función importante en muchas funciones del cuerpo. Además de su función en la biosíntesis de proteínas, la metionina está implicada en la transmetilación y en la biodisponibilidad del selenio y el cinc. La metionina también se usa directamente como tratamiento para trastornos tales como alergia y fiebre reumática. No obstante, la mayoría de la metionina que se produce se añade al pienso.

- 20 Con el menor uso de proteínas derivadas de animales como resultado de la BSE y la gripe aviar, ha aumentado la demanda de metionina pura. Normalmente, la D,L-metionina se produce químicamente a partir de acroleína, metilmercaptano y cianuro de hidrógeno. Sin embargo, las mezclas racémicas no funcionan tan bien como la L-metionina pura (Saunderson, C.L., 1985). Además, aunque la L-metionina pura se puede producir a partir de metionina racémica, por ejemplo, por el tratamiento con acilasa de la N-acetil-D,L-metionina, esto aumenta notablemente los costes de producción. Por consiguiente, la demanda creciente de L-metionina pura junto con la preocupación ambiental hacen de la producción microbiana de la metionina una posibilidad atractiva.

- 25 La optimización de la producción de un producto químico a partir de un microorganismo típicamente implica la sobreexpresión de proteínas implicadas en la ruta de biosíntesis, atenuación de proteínas implicadas en la represión de la ruta de biosíntesis o atenuación de proteínas implicadas en la producción de subproductos no deseados. Todos estos procedimientos para la optimización de la producción de L-metionina en microorganismos se han descrito previamente (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos nº 7.790.424, patente de Estados Unidos nº 7.611.873, solicitudes de patente WO 2002/10209, WO 2006/008097 y WO 2005/059093); sin embargo, la producción industrial de L-metionina a partir de microorganismos requiere mejoras adicionales.

- 30 Típicamente, la L-metionina se ha producido mediante microorganismos desarrollados en glucosa como fuente principal de carbono en un procedimiento fermentativo. En bacterias, la glucosa externa es transportada a la célula y fosforilada por el sistema fosfotransferasa de azúcar del fosfoenolpiruvato (PTS) (Meadow *et al.* 1990; Rohwer *et al.* 1996; Tchieu *et al.* 2001). El PTS consiste en dos proteínas citoplasmáticas comunes, la enzima I y HPr, y una serie de complejos de enzima II específicos de azúcar (EII_s). El PTS enzima IICB^{Glc}, codificado por *ptsG* en *E.coli* transporta y simultáneamente fosforila glucosa a glucosa-6-fosfato (G6P). Aunque la G6P es un producto intermedio esencial en el metabolismo de la glucosa, su acumulación intracelular produce el fenómeno de la toxicidad de azúcar-fosfato, llamada también "estrés por fosfoazúcares". De hecho, se ha descrito que la acumulación de glucosa es muy tóxica para las bacterias, dando lugar a la glicación, mutagénesis de ADN e inhibición del crecimiento (Lee y Cerami, 1987; Kadner *et al.* 1992).

- 35 Estudios recientes han demostrado que en *E. coli* el gen *ptsG* que codifica IICB^{Glc} es altamente regulado de forma bastante intrigante tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, dependiendo de las condiciones fisiológicas (Plumbridge, 1998; Kimata *et al.* 1998; Plumbridge *et al.* 2002; Morita y Aiba, 2007; Görke y Vogel, 2008). Específicamente, se han identificado varios niveles de regulación:

- 45 - regulación de la expresión del gen *ptsG* por muchos reguladores diferentes (ArcA, Fis, Crp) y en particular la represión por DgsA, un regulador transcripcional llamado primer Mlc (*Making larger colonies*);
- desestabilización del ARNm de *ptsG* por el ARN pequeño *sgrS* (*Sugar transport-related sRNA*) por un mecanismo antisentido;
- control de la actividad de PtsG por el polipéptido pequeño SgrT por un mecanismo todavía desconocido; y
- 50 - regulación de la expresión de *sgrS/sgrT* por el regulador transcripcional SgrR.

Debido a la toxicidad de G6P y la naturaleza altamente regulada y compleja del sistema, la manipulación de sistema de transporte de glucosa en microorganismos es muy difícil. Hasta la fecha ha habido varios intentos de mejorar la producción de aminoácidos y en particular la producción de treonina aumentando la importación de glucosa manipulando los genes *ptsG* o *dgsA* (documentos WO0300475 y WO03004670 de Degussa; US2004229320 de

Ajinomoto y WO0281721 de Degussa). No obstante, no hay ejemplos de mejora de la producción de metionina mediante el aumento de la importación de glucosa de la bacteria

Resumen de la invención

Los autores de la presente invención han superado las dificultades descritas anteriormente para mejorar la producción de L-metionina por un microorganismo mediante el aumento de la importación de glucosa. Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante para la producción de metionina mejorada, que comprende: a) modificaciones para producir metionina a partir de glucosa como una fuente principal de carbono por fermentación, y b) modificaciones para mejorar la importación de glucosa por sobreexpresión del gen *ptsG* y eliminación del gen *dgsA* (*mlc*) y en donde la expresión de al menos uno de los siguientes genes se atenúa: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *yncA* o *udhA*.

Los autores de la invención muestran que, mediante la modificación de la expresión de los genes implicados en la importación de glucosa, se mejora la importación de glucosa en el microorganismo y aumenta la producción de metionina por el microorganismo. Además, los autores de la invención han encontrado que la modificación de la expresión de los genes implicados en la importación de glucosa disminuye la producción de los subproductos cetometilvalerato (KMV) y homolantionina (HLA), mejorando así la pureza del producto metionina. En la presente invención, se potencia la expresión del gen *ptsG* que codifica IICB^{Glc}. Aunque la expresión del gen *ptsG* se puede potenciar por cualquier medio conocido en la técnica, en una realización, el gen *ptsG* es sobreexpresado bajo el control de un promotor inducible o uno constitutivo. En otra realización, el gen *ptsG* no contiene la secuencia del sitio de unión para el ARN pequeño *sgrS*.

En el microorganismo recombinante de la presente invención, se elimina el gen *dgsA*.

Por lo tanto, la importación de glucosa se puede mejorar mediante la combinación de la sobreexpresión del gen *ptsG* y la eliminación del gen *dgsA*.

El microorganismo de la presente invención también se modifica para producir metionina por la atenuación de la expresión de al menos uno de los siguientes genes: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *yncA*, o *udhA*. Aunque se entenderá que el microorganismo puede comprender cualquier otra modificación conocida en la técnica para promover la producción de metionina en un microorganismo, en una realización, se potencia la expresión de al menos uno de los siguientes genes: *pyc*, *pntAB*, *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *metF*, *metH*, *thrA*, un alelo de *metA* que codifica una enzima con menor sensibilidad por retroalimentación a la S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**), o un alelo de *thrA* que codifica una enzima con menor inhibición por retroalimentación de treonina (*thrA**). En una realización, al menos un gen está bajo el control de un promotor inducible.

En el microorganismo recombinante de la invención, se atenúa la expresión del gen *metJ* y se potencia la expresión de un alelo de *metA* que codifica una enzima con menor sensibilidad por retroalimentación a la S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**). En una realización adicional, se atenúa la expresión del gen *metJ*; se potencia la expresión de un alelo de *metA* que codifica una enzima con menor sensibilidad por retroalimentación a la S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**); y se potencia la expresión de un alelo de *thrA* que codifica una enzima con menor inhibición por retroalimentación de treonina (*thrA**). En otra realización más, se atenúa la expresión del gen *metJ*; se potencia la expresión de un alelo de *metA* que codifica una enzima con menor sensibilidad por retroalimentación a la S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**); se potencia la expresión de un alelo de *thrA* que codifica una enzima con menor inhibición por retroalimentación de treonina (*thrA**); y se potencia la expresión del gen *cysE*. En una realización adicional más, se atenúa la expresión del gen *metJ*; se potencia la expresión de un alelo de *metA* que codifica una enzima con menor sensibilidad por retroalimentación a la S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**); se potencia la expresión de un alelo de *thrA* que codifica una enzima con menor inhibición por retroalimentación de treonina (*thrA**); se potencia la expresión del gen *cysE*; y se potencia la expresión de los genes *metF* y/o *metH*. En una realización particular, la presente invención comprende un microorganismo en donde: a) el gen *pstG* no contiene el sitio de unión del ARNp *sgrS* y/o se elimina el gen *sgrS* y/o se elimina el gen *sgrT* y/o se elimina el gen *dgsA*; b) se potencia la expresión de los genes *metA**, *metH*, *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP*, *metF*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *thrA* * y *pyc*.

El microorganismo de la presente invención produce menos cetometilvalerato (KMV) y homolantionina (HLA) y como tal produce metionina de mejor pureza. En una realización, la metionina producida tiene mayor pureza. En una realización, se proporciona un método para la producción fermentativa de metionina de mayor pureza, que comprende las etapas de: a) cultivar el microorganismo recombinante descrito antes en un medio de cultivo adecuado que comprende una fuente de carbono fermentable que contiene glucosa y una fuente de azufre, y b) recuperar la metionina o derivados de metionina del medio de cultivo.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción fermentativa de metionina de mayor pureza, que comprende las etapas de: a) cultivar el microorganismo recombinante en un medio de cultivo adecuado que comprende una fuente de carbono fermentable que contiene glucosa y una fuente de azufre, en donde dicho microorganismo comprende: i) modificaciones para producir metionina a partir de glucosa como fuente

de carbono principal por fermentación, y ii) modificaciones para mejorar la importación de glucosa por sobreexpresión del gen *ptsG* y eliminación del gen *dgsA*, y en donde se atenúa la expresión de al menos uno de los siguientes genes: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *yncA* o *udhA*, y b) recuperar la metionina o derivados de metionina del medio de cultivo.

5 Se apreciará que la presente invención también se refiere a un método de producción de metionina o derivados de metionina. En una realización, se proporciona un método para la producción fermentativa de metionina o derivados de metionina, que comprende las etapas de: a) cultivar el microorganismo recombinante descrito antes en un medio de cultivo adecuado que comprende una fuente de carbono fermentable que contiene glucosa y una fuente de azufre, y b) recuperar la metionina o derivados de metionina del medio de cultivo.

10 La presente invención proporciona, por lo tanto, un método para la producción fermentativa de metionina o derivados de metionina, que comprende las etapas de: a) cultivar el microorganismo recombinante en un medio de cultivo adecuado que comprende una fuente de carbono fermentable que contiene glucosa y una fuente de azufre, en donde dicho microorganismo comprende: i) modificaciones para producir metionina a partir de glucosa como fuente de carbono principal por fermentación, y ii) modificaciones para mejorar la importación de glucosa por sobreexpresión del gen *ptsG* y eliminación del gen *dgsA*, y en donde se atenúa la expresión de al menos uno de los siguientes genes: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *yncA* o *udhA*, y b) recuperar la metionina o derivados de metionina del medio de cultivo.

Descripción detallada de la invención.

20 Antes de describir la presente invención con detalle, se debe entender que esta invención no está limitada a los métodos ilustrados en particular y, por supuesto, puede variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es solo para el fin de describir realizaciones particulares de la invención, y no se pretende que sea limitante, la cual estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

25 Las publicaciones mencionadas en la presente memoria se citan con el fin de describir y desvelar los protocolos, reactivos y vectores que se dan en las publicaciones y que se podrían usar en relación con la invención. Nada en la presente invención debe considerarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder dicha descripción en virtud de la invención anterior.

30 Además, la práctica de la presente invención usa, salvo que se indique otra cosa, las técnicas de microbiología y biología molecular convencionales dentro de la técnica. Dichas técnicas son bien conocidas para el experto, y se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Prescott et al. (1999); y Sambrook et al., (1989) (2001).

35 Debe indicarse que, como se usa en la presente memoria y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen la referencia plural salvo que el contexto dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a “un microorganismo” incluye una pluralidad de dichos microorganismos, y una referencia a “una enzima” es una referencia a una o más enzimas, etc. Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se puede usar cualquier material y método similar o equivalente a los descritos en la presente memoria para la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los materiales y métodos preferidos.

40 Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos se pueden usar para la interpretación de las reivindicaciones y la memoria descriptiva.

45 En las reivindicaciones que siguen y en la descripción precedente de la invención, excepto donde el contexto requiera otra cosa debido al lenguaje expreso o implicación necesaria, la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende” se usan en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características expuestas pero no para excluir la presencia o adición de características adicionales en diferentes realizaciones de la invención.

En la descripción de la presente invención, se identifican genes y proteínas usando las denominaciones de los correspondientes genes en *E. coli*. Sin embargo, y salvo que se especifique de otra forma, el uso de estas denominaciones tiene un significado más general de acuerdo con la invención y cubre todos los genes correspondientes y proteínas en otros organismos, más en particular microorganismos.

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

55 Los COG (agrupaciones de grupos de ortólogos de proteínas; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen por comparación de secuencias de proteínas de 66 genomas completamente secuenciados que representan 38 líneas filogénicas principales. Cada COG se define a partir de al menos tres líneas, lo que permite la identificación de

antiguos dominios conservados.

Los medios para identificar secuencias homólogas y sus porcentajes de homologías son bien conocidos para los expertos en la técnica, e incluyen en particular los programas BLAST, que se pueden usar desde el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros por defecto indicados en el sitio web. Las secuencias obtenidas después se pueden explotar (p. ej., alinear) usando, por ejemplo, los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) o MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), con los parámetros por defecto indicados en estos sitios web.

Usando las referencias dadas en GenBank para genes conocidos, los expertos en la técnica pueden determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo 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. Estos métodos rutinarios de biología molecular son bien conocidos para los expertos en la técnica, y se reivindican, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989).

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante para la producción de metionina. Específicamente, la presente invención se refiere a mejorar la producción de metionina en un microorganismo aumentando la importación de glucosa.

La expresión “producción de metionina mejorada” se refiere a una mayor productividad de metionina y/o una mayor valoración de metionina y/o un mayor rendimiento de metionina/fuente de carbono y/o una mayor pureza de la metionina. La expresión “mayor rendimiento de metionina/fuente de carbono” define la cantidad de metionina obtenida durante la fermentación dividida entre la cantidad de glucosa que se ha consumido. Se puede expresar en porcentaje de g de metionina/g de glucosa o moles de metionina/moles de glucosa. El término “mayor” en este contexto describe un aumento medible comparado con el microorganismo sin las modificaciones especificadas. En realizaciones preferidas, el aumento es de al menos aproximadamente 7%, preferiblemente al menos aproximadamente 15%, preferiblemente al menos aproximadamente 25%, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 30%. El rendimiento total de metionina/glucosa es preferiblemente al menos aproximadamente 7% en g/g, preferiblemente al menos aproximadamente 15% en g/g, preferiblemente al menos aproximadamente 20% en g/g, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 24% en g/g.

Los métodos para determinar la cantidad de glucosa consumida y metionina producida son bien conocidos para los expertos en la técnica y se describen en otra parte en la presente memoria.

Las expresiones “mayor pureza de metionina” o “metionina de mayor pureza” se refieren a la cantidad de cetometilvalerato (KMV) y/u homolantionina (HLA) obtenida durante la fermentación comparada con la cantidad de metionina producida. En este contexto la relación de la cantidad de KMV y HLA comparada con la cantidad de metionina mejora en el microorganismo de la invención. Esta relación se puede mejorar disminuyendo la cantidad de KLV y HLA producida o mejorando la cantidad de metionina producida mientras la concentración de KMV y HLA permanecen constantes, o ambos. Ventajosamente, se refiere también a la cantidad de glucosa que queda en el caldo de fermentación al final del cultivo, comparada con la cantidad de metionina producida. En esta invención, la relación de glucosa que queda en el caldo de fermentación comparada con la cantidad de metionina producida aumenta en el microorganismo de la invención. Esta relación se puede mejorar disminuyendo la cantidad de glucosa que queda en el caldo de fermentación o mejorando la cantidad de metionina producida mientras que la cantidad total de glucosa inyectada en el fermentador permanece constante, o ambos.

Los métodos para determinar la cantidad de metionina, NAM, KMV, HLA y glucosa contenida en el medio, son bien conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la cantidad de L-metionina se puede medir por HPLC después de derivatización con OPA/Fmoc usando L-metionina (Fluka, Ref 64319) como una referencia.

Como se ha descrito antes, la glucosa externa es transportada a las células bacterianas y fosforilada por el sistema de fosfotransferasa de azúcar del fosfoenolpiruvato (PTS) (Meadow et al. 1990; Rohwer et al. 1996; Tchieu et al. 2001). La glucosa fosforilada es tóxica para las células en altas concentraciones y el sistema de PTS está altamente regulado. Esto, junto con el hecho de que el sistema es complejo, hace muy difícil la manipulación del sistema. Sin embargo, como se describe más adelante, los autores de la presente invención han producido un microorganismo recombinante con mejor importación de glucosa.

La expresión “microorganismo recombinante”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una bacteria, levadura o un hongo que no se encuentra en la naturaleza y es genéticamente diferente de los microorganismos equivalentes que se encuentran en la naturaleza. De acuerdo con la invención, el término “modificaciones” designa cualquier cambio genético introducido o inducido en el microorganismo. El microorganismo puede ser modificado por la introducción o eliminación de nuevos elementos genéticos. Además, un microorganismo se puede modificar forzando el desarrollo y la evolución de nuevas rutas metabólicas combinando mutagénesis dirigida y evolución bajo una presión de selección específica (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/076659). Preferiblemente, el microorganismo se selecciona del grupo que comprende *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae*, *Corynebacteriaceae* y *Saccharomycetaceae*. Más preferiblemente el microorganismo es una

especie de *Enterobacteriaceae* o *Corynebacteriaceae* o *Saccharomyces cerevisiae*. En una realización, el microorganismo es *Escherichia coli* (*E. coli*).

En particular, los ejemplos muestran cepas de *E. coli* modificadas, pero estas modificaciones se pueden llevar a cabo fácilmente en otros microorganismos de la misma familia.

- 5 *E. coli* pertenece a la familia de *Enterobacteriaceae* que comprende miembros que son Gram negativos, en forma de varilla, no formadores de esporas y típicamente de 1-5 µm de longitud. La mayoría de los miembros tienen flagelos usados para moverse alrededor, pero unos pocos géneros no son móviles. Muchos miembros de esta familia son una parte normal de la flora intestinal que se encuentra en los intestinos de seres humanos y otros animales, mientras que otros se encuentran en el agua o suelo, o son parásitos en una variedad de diferentes animales y plantas. *E. coli* es uno de los organismos modelo más importantes, pero otros miembros importantes de la familia de *Enterobacteriaceae* incluyen *Klebsiella*, en particular *Klebsiella pneumoniae*, y *Salmonella*.

15 La expresión “mejora la importación de glucosa”, “importación de glucosa mejorada” y equivalentes gramaticales de las mismas, como se usa en la presente memoria, se refieren a una mayor tasa de absorción de glucosa. La expresión “mayor tasa de absorción de glucosa” se refiere a la cantidad de glucosa consumida durante la fermentación dividido entre la concentración de biomasa. Específicamente, la tasa de absorción de glucosa se puede definir como se describe a continuación:

$$q_S = \frac{r_S}{X}, \text{ donde } r_S \text{ es la tasa de absorción de glucosa y } X \text{ la concentración de biomasa.}$$

La tasa de absorción de glucosa se puede describir como: $r_S = \frac{dS}{dt}$, donde S es la cantidad de glucosa consumida

- 20 en el tiempo t. Para la fermentación semicontinua, la cantidad de glucosa consumida durante el cultivo corresponde a la glucosa presente en el cultivo discontinuo más la glucosa añadida en el inóculo más la glucosa inyectada durante la fase semicontinua menos la glucosa residual al final del experimento que se resta. Se pueden usar otras técnicas y se describen en la bibliografía:

- 25 - El uso del análogo de glucosa fluorescente (2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-desoxiglucosa o 2-NBDG) para medir las tasas de absorción de glucosa (Natarajan A. y Srienc F. (1999) *metabolic engineering*, vol 1, issue 4, 320-333),

- Medición de la actividad de PtsG (Kornberg H. L. y Reeves R. E. *Biochem. J* (1972) 128, 1339-1344; Rungrassamee et al., *Erich Microbiol* (2008) 190:41-49),

- 30 - Caracterización por qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa) que se usa para cuantificar un objetivo específico como el ARNm de *ptsG* y confirma una expresión potenciada del gen correspondiente.

El término “mayor” en este contexto describe un aumento medible comparado con el microorganismo sin las modificaciones especificadas.

- 35 De acuerdo con la presente invención, la importación de glucosa mejora por la sobreexpresión del gen *ptsG* y la eliminación del gen *dgsA*. Además, la mejora de la importación de glucosa por la sobreexpresión del gen *ptsG* o por una mayor actividad de PtsG en el microorganismo se puede medir por diferentes técnicas conocidas por el experto en la técnica.

- 40 La expresión “modificar la expresión”, como se usa en la presente memoria, indica que la expresión de un gen aumenta o disminuye por la introducción o eliminación de elementos genéticos. Típicamente, la expresión del gen aumenta o disminuye en comparación con un microorganismo equivalente que no se ha modificado, es decir, un microorganismo que no comprende la introducción o eliminación de elementos genéticos para mejorar el transporte de glucosa. Los métodos para determinar si la expresión de un gen es mayor o menor con respecto a una referencia, son bien conocidos para el experto en la técnica y se describen también más adelante.

- 45 La importación de glucosa mejora de acuerdo con la presente invención principalmente por la sobreexpresión del gen *ptsG*. El gen *ptsG* codifica la enzima PTS IICB^{Glc} (sinónimos - EC 2.7.1.69; proteína-N(pi)-fosfohistidina-fosfotransferasa de azúcar; enzima II del sistema fosfotransferasa; enzima II de fosfotransferasa PEP-azúcar; PTS permeasa) en *E.coli*. La secuencia de nucleótidos del gen *ptsG* se muestra en la SEQ ID NO: 18.

- 50 Los términos “potenciado”, “potenciar” y equivalentes gramaticales de los mismos, como se usan en la presente memoria, se refieren a una modificación que aumenta o regula por aumento la expresión de un gen comparado con un microorganismo equivalente que no se ha modificado. Las frases “expresión potenciada”, “mayor expresión” o “sobreexpresión” se usan de forma intercambiable en el texto y tienen significado similar.

Son conocidos diferentes medios para aumentar la expresión de un gen en un microorganismo por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, aumentar la estabilidad del ARN mensajero, aumentar el número de copias del gen,

usar un promotor más fuerte, eliminar elementos reguladores o usar un alelo con mayor actividad, o posiblemente combinar estas medidas. Además, la expresión de un gen se puede aumentar por medios cromosómicos o extracromosómicos. Por ejemplo, se pueden introducir varias copias del gen en el genoma del microorganismo por métodos de recombinación. Alternativamente, los genes los pueden llevar diferentes tipos de plásmidos que difieren con respecto a su origen de replicación y por lo tanto su número de copias en la célula. Los genes pueden estar presentes en 1-5 copias, aproximadamente 20 o hasta 500 copias, que corresponde a plásmidos con número de copias bajo con replicación ajustada (pSC101, RK2), plásmidos de bajo número de copias (pACYC, pRSF1010) o plásmidos de alto número de copias (pSK bluescript II). Los elementos reguladores son importantes para controlar la expresión de genes. Por ejemplo, los genes se pueden expresar usando promotores de diferentes resistencias, que además pueden ser inducibles. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos. Depende de la capacidad del experto en la técnica el seleccionar promotores adecuados; sin embargo, por ejemplo, los promotores *P_{trc}*, *P_{tac}*, *P_{lac}* o el promotor lambda *cI* se usan ampliamente. En una realización, se potencia la expresión del gen *ptsG* poniendo el gen bajo el control de un promotor inducible o constitutivo.

En otra realización la expresión del gen *ptsG* se potencia eliminando la secuencia que codifica el sitio de unión del ARN pequeño *sgrS*.

La expresión "eliminación de la secuencia que codifica el sitio de unión del ARN pequeño *sgrS*" significa que el sitio de unión del ARN pequeño *sgrS* (SEQ ID NO: 19) se elimina total o parcialmente para así prevenir la unión del ARN pequeño *sgrS* en el gen *ptsG*.

La importación de glucosa también mejora de acuerdo con la invención por la eliminación del gen *dgsA*.

En una realización, se atenúa la expresión del gen *sgrS* y/o el gen *sgrT* en el microorganismo recombinante de la invención. El gen *sgrS* codifica el ARN pequeño ARN_p relacionado con el transporte de azúcar en *E. coli*. La secuencia de nucleótidos del gen *sgrS* se muestra en la SEQ ID NO: 20. El gen *sgrT* codifica el polipéptido pequeño SgrT en *E. coli*. La secuencia de nucleótidos del gen *sgrT* se muestra en la SEQ ID NO: 21. El *dgsA* codifica un regulador global que actúa como un represor transcripcional para varios genes, en especial el gen *ptsG* y el operón *ptsHlcr* de *E. coli*. La secuencia de nucleótidos del gen *dgsA* se muestra en la SEQ ID NO: 22.

El término "atenuado", como se usa en la presente memoria, se refiere a la supresión parcial o completa de la expresión de un gen. Esta supresión de la expresión puede ser bien una inhibición de la expresión del gen, una eliminación de toda o parte de la región promotora necesaria para la expresión del gen, una eliminación en la región que codifica el gen y/o el intercambio del promotor de tipo natural por un promotor natural o sintético más débil. Preferiblemente, la atenuación de un gen es esencialmente la eliminación completa de ese gen, que se puede sustituir por un gen marcador de selección que facilita la identificación, aislamiento y purificación de cepas de acuerdo con la invención. Por ejemplo, la supresión de la expresión del gen se puede lograr por la técnica de la recombinación homóloga (Datsenko y Wanner, 2000). En una realización, la importación de glucosa mejora por eliminación del gen *sgrS*. En otra realización, la importación de glucosa mejora por eliminación del gen *SgrT*.

En una realización de adicional, la importación de glucosa mejora por una combinación de las modificaciones descritas antes. Por ejemplo, en el microorganismo de la invención la importación de glucosa se puede mejorar por:

- potenciación de la expresión del gen *ptsG* y eliminación del gen *dgsA* y atenuación de la expresión del gen *sgrS*;
- potenciación de la expresión del gen *ptsG* y eliminación del gen *dgsA* y atenuación de la expresión del gen *sgrT*;
- potenciación de la expresión del gen *ptsG* y eliminación del gen *dgsA* y atenuación de la expresión del gen *sgrS* y el gen *sgrT*.

En una realización preferida de la invención, la importación de glucosa mejora por la sobreexpresión del gen *ptsG* y eliminación del gen *dgsA* y los genes *sgrT* y *sgrS*.

Las modificaciones para mejorar el transporte de glucosa con el fin de mejorar la producción de metionina no se hacen de forma aislada, sino en combinación con modificaciones que promueven la producción fermentativa de la metionina por un microorganismo a partir de glucosa como una fuente principal de carbono. En el microorganismo recombinante de la invención, se atenúa la expresión de al menos uno de los siguientes genes: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *yncA*, o *udhA*. Otras modificaciones que promueven la producción de metionina en un microorganismo son bien conocidas para el experto en la técnica. En una realización, se potencia la expresión de al menos uno de los siguientes genes: *pyc*, *pntAB*, *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *metF*, *metH*, *thrA*, un alelo de *metA* que codifica una enzima con menor sensibilidad por retroalimentación a la S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**), o un alelo de *thrA* que codifica una enzima con menor inhibición por retroalimentación de treonina (*thrA**). En una realización particular de la invención al menos uno de estos genes puede estar bajo el control de un promotor inducible. En una realización preferida de la invención el gen *thrA** es expresado bajo un promotor inducible.

Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de modificación de la expresión de genes en un microorganismo y se describen más arriba y a continuación.

Además, la producción fermentativa de metionina por un microorganismo a partir de glucosa como fuente principal de carbono se puede lograr por una combinación de las modificaciones descritas antes, por ejemplo:

- se atenúa la expresión del gen *metJ* y se potencia la expresión de un alelo de *metA* que codifica una enzima con menor sensibilidad por retroalimentación a la S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**);

5 - se atenúa la expresión del gen *metJ*; se potencia la expresión de un alelo de *metA* que codifica una enzima con menor sensibilidad por retroalimentación a la S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**); y se potencia la expresión de un alelo de *thrA* que codifica una enzima con menor inhibición por retroalimentación de treonina (*thrA**);

10 - se atenúa la expresión del gen *metJ*; se potencia la expresión de un alelo de *metA* que codifica una enzima con menor sensibilidad por retroalimentación a la S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**); se potencia la expresión de un alelo de *thrA* que codifica una enzima con menor inhibición por retroalimentación de treonina (*thrA**); y se potencia la expresión del gen *cysE*;

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

En una realización específica de la invención, el microorganismo recombinante comprende las siguientes modificaciones genéticas además de las mencionadas antes de acuerdo con la presente invención:

a) el gen *pstG* no contiene el sitio de unión del ARNp *sgrS* y/o se elimina el gen *sgrS* y/o se elimina el gen *sgrT*;

20 b) se potencia la expresión de los genes *metA**, *metH*, *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP*, *metF*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *thrA** y *pyc*; y

c) se atenúa la expresión de los genes *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU* y *yncA*.

La presente invención se refiere también a un método de producción de metionina o derivados de metionina, que comprende cultivar el microorganismo descrito antes, en un medio de cultivo adecuado que comprende una fuente de carbono fermentable que contiene glucosa y una fuente de azufre, y recuperar la metionina o derivados de metionina del medio de cultivo.

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

30 La fermentación se lleva a cabo en general en fermentadores con un medio de cultivo inorgánico de composición definida conocida adaptado al microorganismo que se usa, que contiene al menos una fuente de carbono simple, y si es necesario un cosustrato para la producción del metabolito. En particular, el medio de cultivo inorgánico para *E. coli* puede ser de la misma composición o similar a un medio M9 (Anderson, 1946), un medio M63 (Miller, 1992) o un medio tal como el definido por Schaefer et al. (1999, *Anal. Biochem.* 270: 88-96).

35 La expresión "fuente de carbono fermentable" se refiere a cualquier fuente de carbono capaz de ser metabolizada por un microorganismo en donde el sustrato contiene al menos un átomo de carbono. En una realización particular de la invención, la fuente de glucosa deriva de materia prima renovable. La materia prima renovable se define como materia prima necesaria para determinados procedimientos industriales que se puede regenerar en un espacio breve y en suficiente cantidad para permitir su transformación en el producto deseado.

De acuerdo con la presente invención, la fuente de carbono contiene glucosa.

40 Después de fermentación, la metionina o derivados de metionina se pueden recuperar del medio de cultivo y, si es necesario, purificar. Los métodos de recuperación y purificación de un compuesto tal como metionina y derivados de metionina del medio de cultivo son bien conocidos para los expertos en la técnica.

45 Los derivados de metionina proceden de rutas de transformación y/o degradación de la metionina. En particular estos productos son la S-adenosil-metionina (SAM) y N-acetilmetionina (NAM). En particular, la NAM es un derivado de metionina fácilmente recuperable que se puede aislar y transformar en metionina por desacilación. Por consiguiente, la frase "recuperar metionina o derivados de metionina del medio de cultivo" se refiere a la acción de recuperar metionina, SAM, NAM y todos los demás derivados que puedan ser útiles.

Dibujos

Figura 1: Concentración de glucosa residual en g/l, durante los cultivos de las cepas 1 y 2.

50 (◆): cepa 1, llamada cepa Ref; (▲): cepa 2 en condiciones 20/20 de concentración de IPTG y

(●): cepa 2 en condiciones 20/80 de concentración de IPTG.

Ejemplos

Protocolos

Se han usado varios protocolos para construir cepas que producen metionina descritos en los siguientes ejemplos.

- 5 Protocolo 1: Modificaciones cromosómicas por recombinación homóloga y selección de recombinantes (Datsenko y Wanner, (2000)).

10 La sustitución alélica o alteración génica en un locus de cromosoma específico se llevó a cabo por recombinación homóloga como describen Datsenko y Wanner, (2000). El gen *cat* de resistencia a cloranfenicol (Cm) o *kan* de resistencia a la kanamicina (Km), flanqueado por sitios de reconocimiento Flp, se amplificaron por PCR usando los plásmidos pKD3 o pKD4 como molde respectivamente. Los productos de la PCR resultantes se usaron para transformar la cepa de *E. coli* receptora que alberga el plásmido pKD46 que expresa la recombinasa γ Red (γ , β , α). Después se seleccionaron los transformantes resistentes a antibiótico y se verificó la estructura cromosómica del locus mutado por análisis por PCR con los cebadores adecuados listados en la tabla 1 más adelante.

15 El gen de resistencia *cat* se puede intercambiar por el gen de resistencia *kan* usando el plásmido pCP20 que lleva el gen que codifica la recombinasa Flp como describen Datsenko y Wanner, (2000) y el plásmido pKD4 que lleva el gen *kan*. Los plásmidos pCP20 y pKD4 se introdujeron en la cepa adecuada y los transformantes se extendieron en LB complementado con kanamicina a 37°C con el objetivo de expresar el gen *flp* y después los clones que crecían se verificaron por PCR usando los oligonucleótidos citados en la tabla 1.

20 Los genes de resistencia se separaron usando el plásmido pCP20 como describen Datsenko y Wanner, (2000). Brevemente, los clones que albergaban el plásmido pCP20 se cultivaron a 37°C en LB y después se ensayó la pérdida de resistencia a antibiótico a 30°C. Después se verificaron los clones sensibles a antibiótico por PCR usando los cebadores citados en la tabla 1.

Protocolo 2: Transducción del fago P1

25 Se transfirieron las modificaciones cromosómicas a una cepa receptora de *E. coli* dada por transducción de P1. El protocolo está compuesto de 2 etapas: (i) preparación de lisado de fago en una cepa donadora que contiene la modificación cromosómica asociada a la resistencia, y (ii) infección de la cepa receptora por este lisado de fago.

Preparación del lisado de fago

- Inocular 100 μ l de un cultivo de una noche de la cepa MG1655 con la modificación cromosómica de interés en 10 ml de LB + Cm 30 μ g/ml o Km 50 μ g/ml + glucosa al 0,2% + CaCl₂ 5 mM.
- 30 - Incubar 30 min a 37°C con agitación.
- Añadir 100 μ l de lisado de fago P1 preparado en la cepa donadora MG1655 (aprox. 1×10^9 fagos/ml).
- Agitar a 37°C durante 3 horas hasta la lisis completa de las células.
- Añadir 200 μ l de cloroformo y mezclar en mezcladora vorticial.
- Centrifugar 10 min a 4500 g para eliminar los residuos celulares.
- 35 - Transferir el líquido sobrenadante a un tubo estéril.
- Almacenar el lisado a 4°C.

Transducción

- Centrifugar 10 min a 1500 g 5 ml de un cultivo de una noche de la cepa receptora de *E. coli* cultivada en medio LB.
- Suspender el sedimento celular en 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM.
- 40 - Infectar 100 μ l de células con fago 00 μ l P1 de la cepa MG1655 con la modificación en el cromosoma (tubo de ensayo) y como tubos de control 100 μ l de células sin fago P1 y 100 μ l de fago P1 sin célula.
- Incubar 30 min a 30°C sin agitación.
- Añadir 100 μ l de citrato sódico 1 M en cada tubo y mezclar con mezcla vorticial.
- Añadir 1 ml de LB
- 45 - Incubar 1 hora a 37°C con agitación.

- Centrifugar 3 min a 7000 rpm.
- Cultivar en LB + Cm 30 µg/ml o Km 50 µg/ml.
- Incubar a 37°C durante la noche.

Tabla 1: Oligonucleótidos usados en los siguientes ejemplos.

Nombre del oligonucleótido	SEQ ID N°	Secuencia 5' → 3'
Ome2070-EcoRI-Placq-F	1	CCGGAATTCCATTTACGTTGACACCATCGAATGG
Ome2071-NheI-TT02-lacq-R	2	GATTAATTGTCAACAGCTCCGTAGCTAGCAACAG ATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCT TTCGTTTTATTTGATGTACGTCACTGCCCGCTTTC CAGTC
Ome2072-GfpTurboOpt-RBS01*2-AvrII-OP01-Ptrc01-NheI-TT02-F	3	CGTTTTATCTGTTGCTAGCTACGGAGCTGTTGAC AATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATT GTGAGCGGATAACAATTTACCTAGGTAAGGAG GTTATAAATGGAATCTGATGAAAG
Ome2073-EcoRI-SfiI-PacI-TT07-R	4	CCAGAATTCGGCCCGGGCGGCCTTAATTAAGCAG AAAGGCCCAACCGAAG
Ome2115-AvrII-RBS01*2-ptsG-F	5	CCAAGGAAAAGCGGCCGCCCTAGGAAGGAGGTT ATAAATGTTTAAGAATGCATTTGCTAACC
Ome2116-BstZ17I-ptsG-R	6	GACGTATACTTAGTGGTTACGGATGTACTCATC
Ome2127-RHamont-pCC1BAC-Gt-F	7	CCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGCAACCA GGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAA ATTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTG CATCACTTCTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGA GAG
Ome2128-RHaval-pCC1BAC-Gt-R	8	TGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAG TTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAA TGTTACGCAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGG GCAGTCGCCCTAAACAAAGTTAGGTGGCTCAA GTATGG
Ome2371-DsgrS-F1	9	GGACGCAAAAAGAAACGCCAGTG
Ome2372-DsgrS-R1	10	GTCATTATCCAGATCATACGTTCCCTTTTAAACT GACGCATGGGGCACCC
Ome2373-DsgrS-F2	11	GAAGCAAGGGGGTGCCCCATGCGTCAGTTTAAA AAGGGAACGTATGATCTGGATAATGAC
Ome2374-DsgrS-R2	12	GGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGTCA AACGTCCTTAACCTTTGCGG
Ome2375-DsgrS-F3	13	GCATTATTTTAAACCGCAAAGGTTAAAGACGTTT GACATATGAATATCCTCCTTAGTTTCT
Ome2376-DsgrS-R3	14	ATTGGGCTTACCTTGACGACGACGACGCCATTG CCGCTTATGAAGCAAAACAACCTGCGTTTATGAA TTAATCCCCCTGCCCGGTCAAATGACCGGGCTTT CCGCTATCGTCCACGTATGTAGGCTGGAGCTGC TTCG
Ome2378-DsgrS-Fseq	15	GATGGGATGGCTGGCAAAGT
Ome2377-DsgrS-Rseq	16	CGAGTTTTGCTGACATCTTCTACG
melBup-F	23	cgtaggcgccggtaccgacctcaatatcgaccagctacgc

Nombre del oligonucleótido	SEQ ID N°	Secuencia 5' → 3'
melBup-R	24	gcttgatatacaacagataaaaacgaaaggccagctcttcgactgag cctttcgttttatttgatgcattgaaatgctcatagggtatcgggtcgc
melBdown-F	25	agactgggccccttcgttttatctgttgatacaagcttaattaacctag ggcccggggcggatccgtgagtgatgtgaaagcctgacgtgg
melBdown-R	26	cgtaggcgccggtacccgaactgcactaagtaacctcttcgg
Km-F	27	tccccgggggtataccatatgaatatcctccttag
Km-R	28	gccaagcttgtaggctggagctgcttcg
Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-F	29	cgtagttaacttaattaagagctgttgacaattaatcatccggctcgt ataatgtgtggaagggtgagttatctcgagtgagatattgttgacgt aaggaggtataaatgccatatccaagatactcgttgccaatcg
pycre-TT07-R	30	cgacccggggcctagggcagaaaggccaccggaaggtagcc agtgtgagcggccgctcatccgctgtaaacgccagcagg
melB-pycre-F	31	gccgattttgtcgtggtggc
melB-pycre-R	32	gccggttatccatcaggtcac
purUup-F	33	ctgaggcctatgcatggaatgcaatcgtagccacatcgc
purUup-R	34	gcttgatatacaacagataaaaacgaaaggccagctcttcgactgag cctttcgttttatttgatggctggaaaaacctgttgagagtgtttgc
purUdown-F	35	agactgggccccttcgttttatctgttgatacaagcttaattaacctgg gccctcgcccggcggtatccgtaatcgaacgattattctttaatc gcc
purUdown-R	36	ctgaggcctatgcatgcggattcgtgggaagttcaggg
PL1*1/RBS01*2-pycre-F	37	ctctagaactagtattatctctggcgggtgttgacataaataccactggc ggttatactgagcacagtcgacgttaacacgcgttaaggaggttat aatgccatatccaagatactcgttgccaatcg
pycre-TT07-R2	38	tcgagccggggcagaaaggccaccggaaggtagccagtag gtaagtactttaattaatcatccgctgtaaacgccag
purU-pycre-F	39	gcccaccagcgaaccaattg
purU-pycre-R	40	gtaaacgtggtgccatcggg
dgsA-F	41	cctggcaaataaccggaatg
dgsA-R	42	ccattcagagagtgacgc

Ejemplo 1: Construcción de la cepa 2.

- 5 1. Cepa productora de metionina 1 MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::TT*adc-C*/857-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-*cysE* Δ *pgaABCD*::TT02-TT*adc*-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 Δ *luxA*CA ::TT07-TT*adc*-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 Δ CP4-6::TT02-TT*adc*-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 Δ *wcaM*::TT02-TT*adc*-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 Δ *treBC*::TT02-*serA-serC* (pCL1920-*PgapA-pycre*-TT07) se ha descrito en la solicitud de patente PCT/FR2010/052937.

2. Construcción de la cepa 2

- 10 Para aumentar la importación de glucosa en la célula, PtsG (IIC^{Glc}), la PTS permeasa específica de glucosa del sistema de fosfotransferasa de glucosa se superprodujo a partir de un cromosoma artificial bacteriano y el uso de un promotor *trc* inducible artificial.

El plásmido pCC1BAC-*Placq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07 deriva de los plásmidos pCC1BAC-*Placq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*GfpTurboOpt*-TT07 (descrito más adelante) y por lo tanto del cromosoma artificial bacteriano pCC1BAC (Epicentre).

Para la construcción del plásmido pCC1BAC-*Placq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*GfpTurboOpt*-TT07, el fragmento *Placq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*GfpTurboOpt*-TT07 se obtuvo por PCR de solapamiento. Primero se amplificó la región *Placq-lacI*-TT02 por PCR a partir del plásmido pTRC99A (Stratagene) usando los siguientes oligonucleótidos, Ome2070-EcoRI-*Placq*-F y Ome2071-NheI-TT02-*lacI*-R, y la región *Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*GfpTurboOpt*-TT07 se amplificó por PCR a partir del plásmido pCR4BluntTOPO-TTadc-C/857*-*PlambdaR**(-35)-RBS01-*GfpTurboOpt*-TT07 (sintetizado por Geneart y descrito más adelante) usando los siguientes oligonucleótidos, Ome2072-*GfpTurboOpt*-RBS01*2-AvrII-OP01-*Ptrc01*-NheI-TT02-F y Ome2073-EcoRI-SfiI-*Pacl*-TT07-R. Después, se llevó a cabo la PCR de solapamiento usando los productos de la PCR *Placq-lacI*-TT02 y *Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*GfpTurboOpt*-TT07 que tienen una región que se solapa como matriz, y los oligonucleótidos Ome2070-EcoRI-*Placq*-F y Ome2073-EcoRI-SfiI-*Pacl*-TT07-R. El producto final de la PCR *Placq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*GfpTurboOpt*-TT07 se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y SfiI y se clonó en los sitios EcoRI / SfiI del vector pCC1BAC. El plásmido recombinante se verificó por secuenciación del ADN, dando el plásmido pCC1BAC-*Placq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*GfpTurboOpt*-TT07.

Ome2070-EcoRI-*Placq*-F (SEQ ID NO 1)

ccggaattcATTTACGTTGACACCATCGAATGG

con

- secuencia en minúsculas para el sitio de restricción de EcoRI y bases extra,

- secuencia en mayúsculas homóloga a la versión modificada *Placq* del promotor del gen *lacI*, que lleva el vector pTRC99A (2967-2991, secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M22744.1>)

Ome2071-NheI-TT02-*lacI*-R (SEQ ID NO 2)

GATTAATTGTCAACAGCTC*cgtagctagcAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTC*
*GACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATG**tacgTCACTGCCCGCTTTCCAGTC*

con

- secuencia en mayúsculas negrilla homóloga al promotor de *trc* artificial, *Ptrc01* (Meynial-Salles et al. 2005)

- secuencia en minúsculas para el sitio de restricción de NheI y bases extra,

- secuencia en mayúsculas itálica para el terminador de la transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* (Orosz et al. 1991), secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>), denominada TT02

- secuencia en mayúsculas homóloga al gen *lacI* (4118-4137, secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M22744.1>, o 365652-365671, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

- secuencia subrayada que muestra la región de solapamiento para la etapa de PCR de solapamiento

Ome2072-*GfpTurboOpt*-RBS01*2-AvrII-OP01-*Ptrc01*-NheI-TT02-F (SEQ ID NO 3)

*CGTTTTATCTGTT**gctagctacgGAGCTGTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAA*
TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATT*tcacctaggtaaggaggtataa*ATGGAATCT

GATGAAAG

con

- secuencia en mayúsculas itálica para el terminador de la transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* (Orosz et al. 1991), secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>), denominado TT02

- secuencia en minúsculas para el sitio de restricción NheI o AvrII y bases extra,

- secuencia en mayúsculas negrilla homóloga al promotor de *trc* artificial, *Ptrc01* y operador, OP01 (Meynial-Salles et al. 2005)

- secuencia en minúsculas negrilla itálica para la secuencia del sitio de unión al ribosoma, denominado RBS01*2

- secuencia en mayúsculas homóloga a una forma modificada del gen *gfp*, que significa optimizado para uso de

codones de *E. coli*, denominada *GfpTurboOpt*

- secuencia subrayada que muestra la región de solapamiento para la etapa de PCR de solapamiento

Ome2073-EcoRI-SfiI-PacI-TT07-R (SEQ ID NO 4)

ccagaattcgccccggcgcccttaattaaGCAGAAAGGCCACCCGAAG

5 con

- secuencia en minúsculas para los sitios de restricción *EcoRI*, *SfiI*, *PacI* y bases extra

- secuencia en mayúsculas itálica para la secuencia terminadora de la transcripción T7Te (Harrington et al. 2001), denominada TT07

10 *GfpTurboOpt*-TT07 región presente en el plásmido pCR4BluntTOPO-TT*adc*-C/857*-PlambdaR*(-35)-RBS01-*GfpTurboOpt*-TT07, sintetizado por Geneart Company (SEQ ID NO 17):

taaggagggtataaatggaatctgatgaaagcggctcgcctgcaatggaattgaatgctgtattaccggcaccctgaatgggtgttg
aatttgaactgggtgggtgggtgaaggtagaccggaacagggcgatgaccaataaaatgaaaagcaccaaagggtgactgac
ctttagcccgtatctgctgtctcatgttatgggctatggcttttaccatgttgccacattccgagcgggtatgaaaatccgtttctgcatgc
cattaataatgggtgggtataccaatacccgcatgaaaaatgaagatgggtgggtgtctgcatgttagcttttagctatcggtatgaagc
cggctgctgtgattgggtgattttaaagttatgggcaccgggtttccggaagatagcgtgattttaccgataaaattattcgagcaatgc
caccgttgaacatctgcacccgatgggtgataatgatctggatggtagctttaccgtagcttttagcctgctgatgggtgatttata
gcagcgttgggtatagccatagcattttaaagcgccattcatccgagcattctgcagaacgggtgggtccgatgtttgcatttcgctgc
gtggaagaagatcatagcaataccgaactgggcattgtgaaatcagcatgcctttaaaccacgggatgcagatgccgggtgaaga
ataaGTATAC***tcacactggctcaccttcgggtgggcctttctgc***

con

- secuencia en minúsculas negrilla itálica para el sitio de unión al ribosoma, denominada RBS01*2

- secuencia en minúsculas homóloga al gen *GfpTurbo* (Evrogen) optimizada para *E. coli*, denominada *GfpTurboOpt*

15 - secuencia en mayúsculas para el sitio de restricción *BstZ17I*

- secuencia subrayada para la secuencia terminadora de la transcripción T7Te (Harrington et al. 2001), denominada TT07.

20 Para intercambiar el gen *GfpTurboOpt* por el gen *ptsG* gen en el vector pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*GfpTurboOpt*-TT07 para obtener el plásmido pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07, primero se digirió parcialmente pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*GfpTurboOpt*-TT07 con las enzimas de restricción *AvrII* y *BstZ17I*. Después, se amplificó la región *ptsG* por PCR a partir de ADN genómico de la cepa de *E. coli* MG1655 usando los siguientes oligonucleótidos, Ome2115-*AvrII*-RBS01*2-*ptsG*-F y Ome2116-*BstZ17I*-*ptsG*-R y el producto resultante de la PCR se digirió con las enzimas de restricción *AvrII* y *BstZ17I* y se clonó en los sitios *AvrII* / *BstZ17I* del vector pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*GfpTurboOpt*-TT07. El plásmido recombinante se verificó por secuenciación del ADN, dando el plásmido pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07.

25 Ome2115-*AvrII*-RBS01*2-*ptsG*-F (SEQ ID NO 5)

ccaaggaaaagcggccgcctagg**TAAGGAGGTTATAAATGTTTAAGAATGCATTTGCTAA**

CC

con

30 - secuencia en minúsculas para los sitios de restricción *NotI*, *AvrII* y bases extra

- secuencia en mayúsculas negrilla para la secuencia del sitio de unión al ribosoma, denominada RBS01*2

- secuencia en mayúsculas homóloga al gen *ptsG* (1157092-1157116, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Ome2116-*BstZ17I*-*ptsG*-R (SEQ ID NO 6)

gacgtatacTTAGTGGTTACGGATGTACTCATC

con

- secuencia en minúsculas para el sitio de restricción *Bst*Z17I y bases extra

- secuencia en mayúsculas homóloga al gen *ptsG* (1158502-1158525, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Finalmente, el plásmido resultante pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc*01/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07 se introdujo en la cepa 1 dando lugar a la cepa 2 de MG1655, MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔtreBC::TT02-serA-serC (pCL1920-PgapA-pycre-TT07) (**pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc*01/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07**).*

En esta construcción pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc*01/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07, el promotor natural, así como el sitio de unión al ARN pequeño *sgrS* se sustituyen por un promotor artificial fuerte. Por consiguiente, *ptsG* es sobreexpresado y su ARNm ya no está regulado y es activado para la degradación por *sgrS*.

La sobreexpresión de *ptsG* en la cepa cultivada en condiciones inducibles (+IPTG en el cultivo) se comprobó por qPCR.

Ejemplo 2: Construcción de la cepa 4

1. Cepa productora de metionina 3 MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-Cl857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔtreBC::TT02-serA-serC ***Ptrc30-pntAB::Cm ΔudhA*** (pCL1920-PgapA-pycre-TT07) se ha descrito en la solicitud de patente WO2012/055798.*

2. Construcción de la cepa 4

Con el fin de sobreproducir *PtsG* en una cepa productora de metionina modificada en su ruta de producción de NADPH (transhidrogenasas *UdhA* y *PntAB*), se tuvo que modificar el casete de resistencia a antibiótico del plásmido pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc*01/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07 (descrito en el ejemplo 1). Se intercambió el gen de resistencia al cloranfenicol de pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc*01/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07 por un gen de resistencia a gentamicina, dando el plásmido pCC1BACVB01-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc*01/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07.

Para proceder a este intercambio de genes de resistencia a antibióticos se usó un procedimiento basado en el sistema Red portado por el vector pKD46 (Genebridges). Para este fin se usaron 2 oligonucleótidos:

Ome2127-RHamont-pCC1BAC-Gt-F (SEQ ID NO 7)

CCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGCAACCAGGCGTTTAAGGGCACCAAT

AACTGCCCTAAAAAAATTAGGTGGCGGTACTTGGGTTCGATATCAAAGTGCATC

ACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAG

con

- secuencia en mayúsculas subrayada homóloga a la región del vector pCC1BAC en 3' del gen de resistencia al cloranfenicol

- secuencia en mayúsculas homóloga al gen de resistencia a la gentamicina que lleva el vector p34S-Gm (Dennis y Zyltra, 1998) (735-805, secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF062079.1>)

y

Ome2128-RHaval-pCC1BAC-Gt-R (SEQ ID NO 8)

TGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGC

TAAGGAAGCTAAAATGTTACGCAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGT

CGCCCTAAAACAAAGTTAGGTGGCTCAAGTATGG

con

- secuencia en mayúsculas subrayada homóloga a la región del vector pCC1BAC en 5' del gen de resistencia al cloranfenicol

- mayúsculas homóloga al gen de resistencia a la gentamicina que lleva el vector p34S-Gm (Dennis y Zyltra, 1998) (272-344, secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF062079.1>)

- 5 Los oligonucleótidos Ome2127-RHamont-pCC1BAC-Gt-F y Ome2128-RHaval-pCC1BAC-Gt-R se usaron para amplificar el casete de resistencia a la gentamicina a partir del plásmido p34S-Gm (Dennis y Zyltra, 1998). El producto de la PCR obtenido después se introdujo por electroporación en la cepa DH5alfa (pCC1BAC-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07) (pKD46) en la que la enzima recombinasa Red permite la recombinación homóloga. Después, se seleccionaron los transformantes resistentes a la gentamicina y resistentes al cloranfenicol y la inserción del casete de resistencia se verificó por análisis de perfil de restricción.

- 10 Finalmente, el plásmido recombinante pCC1BACVB01-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07 se verificó por secuenciación del ADN y se introdujo en la cepa 3 dando la cepa de MG1655 4, MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::TT02-*TTadc-Cl857-PlambdaR**(-35)-*thrA**1-*cysE* Δ *pgaABCD*::TT02-*TTadc-PlambdaR**(-35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 Δ *uxaCA* ::TT07-*TTadc-PlambdaR**(-35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 Δ *CP4-6*::TT02-*TTadc-PlambdaR**(-35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 Δ *wcaM*::TT02-*TTadc-PlambdaR**(-35)-RBS01-*thrA**1-*cysE*-*PgapA-metA**11 Δ *treBC*::TT02-*serA-serC* ***Ptrc30-pntAB::Cm*** ***AudhA*** (pCL1920-*PgapA-pycre*-TT07) (**pCC1BACVB01-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07**).

- 20 En esta construcción pCC1BACVB01-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07, el promotor natural así como el sitio de unión al ARN pequeño *sgrS* se sustituyen por un promotor artificial fuerte. Por consiguiente, *ptsG* es sobreexpresado y su ARNm ya no está regulado y es activado para la degradación por *sgrS*.

La sobreexpresión de *ptsG* en la cepa cultivada en condiciones inducibles (+IPTG en el cultivo) se comprobó por qPCR.

Ejemplo 3: Construcción de la cepa 5

- 25 Para evitar cualquier regulación en el transcrito de *ptsG* y en la proteína PtsG, se eliminó el gen *sgrT*, que codifica un péptido pequeño que regula la actividad de PtsG y la parte del gen *sgrS* que codifica el ARN pequeño de *sgrS* que interfiere con el ARNm de *ptsG*.

- 30 Los genes *sgrS/T* son los primeros genes del operón *sgrS/T-setA*. Con el fin de eliminar los genes *sgrS/T* sin suprimir la expresión del gen en la dirección 3' *setA*, se eliminó *sgrS/T* y al mismo tiempo se movió el gen *setA* en la dirección 3' del promotor del operón. Para este fin, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita en el protocolo 1. La cepa de *Escherichia coli* BW25113 Δ *setA*::Km (pKD46) de la colección de mutantes Keio (Baba et al., 2006) se usó para insertar un casete de resistente al cloranfenicol mientras se eliminaban los genes *sgrS/T* y se restablecía el gen *setA* en la dirección 3' del promotor del operón.

- 35 Específicamente, el fragmento "sgrR-PsgrR-PsgrS-RBSsetA-setA-FRT-Cm-FRT-leuD" (fragmento 4), necesario para eliminar los genes *sgrS/T* se amplificó por PCR de solapamiento. Los primeros fragmentos 1, 2 y 3 que servían como matriz para la PCR de solapamiento final se amplificaron; cada uno de estos fragmentos tiene al menos una región homóloga de 48 nucleótidos de largo entre los extremos 3' y 5' que permite la etapa de la PCR de solapamiento. El fragmento 1, "sgrR-PsgrR-PsgrS-RBSsetA-setA", se amplificó a partir del ADN genómico de *Escherichia coli* MG1655 usando los oligonucleótidos Ome2371-DsgrS-F1 y Ome2372-DsgrS-R1; el fragmento 2, "PsgrR-PsgrS-RBSsetA-setA", se amplificó a partir del ADN genómico de *Escherichia coli* MG1655 usando los oligonucleótidos Ome2373-DsgrS-F2 y Ome2374-DsgrS-R2; el fragmento 3, "FRT-Cm-FRT-leuD", se amplificó por PCR a partir del plásmido pKD3, usando los oligonucleótidos Ome2375-DsgrS-F3 y Ome2376-DsgrS-R3. Finalmente, el fragmento 4 se amplificó por PCR a partir de una mezcla de fragmentos 1, 2 y 3 usados como matriz y usando los oligonucleótidos Ome2371-DsgrS-F1 y Ome2376-DsgrS-R3.

- 45 Ome2371-DsgrS-F1 (SEQ ID NO 9)

GGACGCAAAAAGAAACGCCAGTG

homólogo al gen *sgrR* (76743-76765, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Ome2372-DsgrS-R1 (SEQ ID NO 10)

GTCATTATCCAGATCATACGTTCCCTTTTTAACTGACGCATGGGGCACCC

- 50 Con

- secuencia en mayúsculas homóloga a la región promotora de *sgrR* y *sgrS* (77379-77398, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

- mayúsculas homóloga a la región *setA* (77637-77607, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)
- secuencia subrayada que muestra la región que solapa para la etapa de PCR de solapamiento

Ome2373-DsgrS-F2 (SEQ ID NO 11)

GAAGCAAGGGGGTGCCCCATGCGTCAGTTTAAAAAGGGAACGTATGATCTG
GATAATGAC

5 con

- secuencia en mayúsculas homóloga a la región promotora de *sgrR* y *sgrS* (77370-77398, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)
- secuencia en mayúsculas negrilla homóloga a la región *setA* (77637-77607, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

10 - secuencia subrayada que muestra la región que solapa para la etapa de PCR de solapamiento

Ome2374-DsgrS-R2 (SEQ ID NO 12)

GGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGTCAAACGTCTTTAACCTTTGCGG

con

- 15
- secuencia en mayúsculas itálica para la amplificación del casete de resistencia al cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko y Wanner, 2000)
 - secuencia en mayúsculas negrilla homóloga a la región *setA* (78799-78777, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

- secuencia subrayada que muestra la región que solapa para la etapa de PCR de solapamiento

Ome2375-DsgrS-F3 (SEQ ID NO 13)

GCATTATTTTTTAACCGCAAAGGTTAAAGACGTTTGACATATGAATATCCTCCT
TAGTTCCT

20

con

- secuencia en mayúsculas negrilla homóloga a la región *setA* (78764-78799, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

- 25
- secuencia en mayúsculas itálica para la amplificación del casete de resistencia al cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko y Wanner, 2000)

- secuencia subrayada que muestra la región que solapa para la etapa de PCR de solapamiento

Ome2376-DsgrS-R3 (SEQ ID NO 14)

ATTGGGCTTACCTTGACGACGACGACGCCATTGCCGCTTATGAAGCAAAACA
ACCTGCGTTTATGAATTAATCCCTTGCCCGGTCAAATGACCGGGCTTCCGCT
ATCGTCCACGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

con

- 30
- secuencia en mayúsculas homóloga a la región *setA-leuD* (78919-78800, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

- secuencia en mayúsculas itálica para la amplificación del casete de resistencia al cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko y Wanner, 2000).

35 El producto de la PCR resultante, que corresponde al fragmento 4, después se introdujo por electroporación en la cepa BW25113 Δ *setA*::Km (pKD46), en la que la enzima recombinasa Red permitía la recombinación homóloga. Después, se seleccionaron los transformantes resistentes al cloranfenicol y la inserción del casete de resistencia se verificó por análisis de PCR con los oligonucleótidos Ome2378-DsgrS-Fseq y Ome2377-DsgrS-Rseq definidos más adelante, y se verificó por secuenciación de ADN. La cepa seleccionada se denominó BW25113 Δ *sgrS*::Cm.

Puesto que el marco de lectura abierto de *sgrT* solapa con la secuencia de *sgrS* que codifica el ARN pequeño, la eliminación de *sgrS* da como resultado la eliminación de *sgrT*. Así pues, la eliminación de *sgrS/T* se denominó $\Delta sgrS$.

Ome2378-DsgrS-Fseq (SEQ ID NO 15)

5 GATGGGATGGCTGGCAAAGT

homólogo al gen *sgrR* (76502-76521, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

Ome2377-DsgrS-Rseq (SEQ ID NO 16)

CGAGTTTTGCTGACATCTTCTACG

homólogo al gen *leuD* (79143-79120, secuencia de referencia en el sitio web <http://ecogene.org/>)

10 La eliminación de *sgrS/T* se transfirió por transducción de fago P1 de la cepa BW25113 $\Delta sgrS::Cm$ a la cepa 1. Después, se seleccionaron los transformantes resistentes al cloranfenicol y la inserción del casete de resistencia se verificó por análisis de PCR con los oligonucleótidos Ome2378-DsgrS-Fseq y Ome2377-DsgrS-Rseq. La cepa resultante se denominó cepa 5, MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB $\Delta metJ$ $\Delta pykF$ $\Delta pykA$ $\Delta purU$ $\Delta yncA$ $\Delta malS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE$*
 15 *$\Delta pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta treBC::TT02-serA-serC$*
 $\Delta sgrS::Cm$ (pCL1920-PgapA-pycre-TT07).

Ejemplo 4: Construcción de la cepa 6

20 Con el fin de superar las regulaciones de PtsG en una cepa de metionina modificada en su ruta de producción de NADPH (transhidrogenasas UdhA y PntAB), se eliminaron los genes *sgrS/T* en la cepa 3.

Para este fin, primero se intercambió el casete de resistencia al cloranfenicol de $\Delta sgrS::Cm$ por un casete de resistencia a la kanamicina. Para esto, se introdujeron los plásmidos pCP20 y pKD4 en la cepa de BW25113 $\Delta sgrS::Cm$ y después de extender los transformantes en LB complementado con kanamicina a 37°C, los clones que
 25 crecían se verificaron por PCR usando los oligonucleótidos Ome2378-DsgrS-Fseq y Ome2377-DsgrS-Rseq. Después, la eliminación $\Delta sgrS::Km$ se transfirió por transducción del fago P1 de la cepa de BW25113 $\Delta sgrS::Km$ a la cepa 3. Después, se seleccionaron los transformantes resistentes a la kanamicina y el casete de resistencia se verificó por un análisis de PCR con los oligonucleótidos Ome2378-DsgrS-Fseq y Ome2377-DsgrS-Rseq. La cepa resultante se denominó cepa 6, MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB $\Delta metJ$ $\Delta pykF$ $\Delta pykA$ $\Delta purU$ $\Delta yncA$ $\Delta malS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE$*
 30 *$\Delta pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta treBC::TT02-serA-serC$*
Ptrc30-pntAB::Cm UdhA $\Delta sgrS::Km$ (pCL1920-PgapA-pycre-TT07).

35 Ejemplo 5: Construcción de la cepa 7

Con el fin de aumentar drásticamente la importación de glucosa en la cepa 2 que ya sobreexpresa *ptsG* a partir de pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07, se eliminaron los genes *sgrS/T* en esta cepa.

Para este fin, la eliminación $\Delta sgrS$ se transfirió por transducción de fago P1 desde la cepa de BW25113 $\Delta sgrS::Km$ a la cepa 2. Después, se seleccionaron los transformantes resistentes a cloranfenicol y la inserción del casete de
 40 resistencia se verificó por un análisis de PCR con los oligonucleótidos Ome2378-DsgrS-Fseq y Ome2377-DsgrS-Rseq. La cepa resultante se denominó cepa 7, MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB $\Delta metJ$ $\Delta pykF$ $\Delta pykA$ $\Delta purU$ $\Delta yncA$ $\Delta malS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE$*
 $\Delta pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta treBC::TT02-serA-serC$*
 45 ***$\Delta sgrS::Cm$*** (pCL1920-PgapA-pycre-TT07) (**pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07**).

La sobreexpresión de *ptsG* de la cepa cultivada en condiciones inducibles (+IPTG en el cultivo) se comprobó por qPCR.

50 Ejemplo 6: Construcción de la cepa 15

1. Cepa 8

La cepa productora de metionina 8 se ha descrito en la solicitud de patente WO2012/055798. El genotipo de la cepa

8 es el siguiente MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH* *P_{trc}F-cysPUWAM* *P_{trc}F-cysJIH* *P_{trc}09-gcvTHP* *P_{trc}36-ARNmst17-metF* *P_{trc}07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::TT02-TT07-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ *uxaCA* :: TT07-TT07-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ CP4-6::TT02-TT07-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ wcaM::TT02-TT07-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ treBC::TT02-serA-serC.

2. Construcción de las cepas 9, 10, 11 y 12

Con el fin de expresar el gen de la piruvato carboxilasa de *Rhizobium etli*, denominado *pycre*, se ha integrado dos veces una copia de este gen en el cromosoma en los locus de *melB* y *purU* loci. En el locus *melB*, se expresó el gen *pycre* por adición de una secuencia promotora *P_{trc}* sintética, una secuencia estabilizadora del ARNm y un sitio de unión al ribosoma optimizado integrado en la dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *pycre*. La construcción se ha anotado Δ *melB*::RN/*P_{trc}01*/ARN01/RBS01*2-*pycre*-TT07. En el locus de *purU*, se ha expresado el gen *pycre* por adición del PL1*1 (mutación en la caja -10 del promotor P_{AL}1 del fago lambda) y un sitio de unión al ribosoma optimizado integrado en la dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *pycre*. La construcción se ha anotado Δ *purU*::RN/PL1*1/RBS01*2-*pycre*-TT07.

Todas las descripciones de las integraciones genéticas en diferentes locus en el cromosoma presentada a continuación se construyen de acuerdo con el mismo método; 1) construcción del vector de duplicación que contiene secuencias homólogas en la dirección 5' y dirección 3' del locus de interés, el fragmento de ADN y un casete de resistencia, 2) integración de la modificación de interés en la cepa mínima (MG1655 *metA**11 pKD46) por recombinación homóloga, y 3) transducción de la modificación de interés en la cepa compleja (MG1655 que contiene ya varias modificaciones).

2.1. Construcción de las cepas 9 y 10

Para eliminar el gen *melB* y sustituirlo por la región *P_{trc}01*/ARN01/RBS01*2-*pycre*-TT07, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko y Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o a kanamicina, pero también de un ADN adicional, a la vez que se eliminan la mayoría de los genes implicados. Para este fin, se construyó el siguiente plásmido, pUC18- Δ *melB*::TT02-*P_{trc}01*/ARN01/RBS01*2-*pycre*-TT07::Km. Este plásmido pUC18- Δ *melB*::TT02-*P_{trc}01*/ARN01/RBS01*2-*pycre*-TT07::Km se obtiene a partir del vector pUC18 (Norrand et al., *Gen* 26 (1983), 101-106) y alberga el casete de resistencia a la kanamicina conectado al fragmento *P_{trc}01*/ARN01/RBS01*2-*pycre*-TT07, ambos clonados entre las regiones en la dirección 5' y dirección 3' de *melB*.

Para la construcción de pUC18- Δ *melB*::TT02-*P_{trc}01*/ARN01/RBS01*2-*pycre*-TT07::Km, primero se construyó el plásmido pUC18- Δ *melB*::TT02-SMC. Este plásmido lleva las regiones en la dirección 5' y dirección 3' de *melB* que se separan por un terminador de la transcripción (T₁ del gen *rrnB* de *E. coli*, denominado TT02) y un sitio de clonación múltiple (compuesto de los sitios de restricción *Bst*Z171, *Hind*III, *Pac*I, *Avr*II, *Ap*aI, *Sma*I, *Bam*HI, denominado SMC). Esta última región se amplificó por PCR a partir del ADN genómico usando los siguientes oligonucleótidos:

melBup-F (SEQ ID NO 23)

cgtaggcgccggtaccGACCTCAATATCGACCCAGCTACGC

con

- una región (minúsculas) para los sitios de restricción *Sfo*I y *Kpn*I y bases extra,

- una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia (4340489-4340513) de la región de *melB* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>).

melBup-R (SEQ ID NO 24)

gcttgataacAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTT
TTATTTGATGCATTGAAATGCTCATAGGGTATCGGGTCGC

con

- una región (minúsculas) para el sitio de restricción *Bst*Z171 y parte del sitio de restricción *Hind*III del sitio de clonación múltiple,

- una región (mayúsculas negrilla) para el terminador de la transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* (Orosz et al. 1991),

- una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia (4341377-4341406) de la región *melB* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>).

melBdown-F (SEQ ID NO 25)

AGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTgtatacaagcttaattaacctagggcccgggcgatccGTG
AGTGATGTGAAAGCCTGACGTGG

con

- 5 - una región (mayúsculas negrilla) para parte del terminador de la transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* (Orosz et al. 1991),
- una región (minúsculas) para el sitio de clonación múltiple entero,
- una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia (4342793-4342818) de la región *melB* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>).

melBdown-R (SEQ ID NO 26)

10 cgtaggcgccgtaccCGAACTGCACTAAGTAACCTCTTCGG

con

- una región (minúsculas) para los sitios de restricción *SfoI* y *KpnI* y bases extra,
 - una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia (4343694-4343719) de la región *melB* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>).
- 15 Primero, se amplificaron por PCR los fragmentos "upMelB" y "downMelB" a partir del ADN genómico de MG1655 usando los oligonucleótidos melBup-F/melBup-R y melBdown-F/melBdown-R, respectivamente. En segundo lugar, se amplificó el fragmento "upMelB-downMelB" a partir de los fragmentos de la PCR "upMelB" y "downMelB" (que tienen una región que solapa compuesta de una parte del terminador de la transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* y una parte del sitio de clonación múltiple) usando los oligonucleótidos melBup-F/melBdown-R. El fragmento de la
- 20 PCR "upMelB-downMelB" se cortó con la enzima de restricción *SfoI* y se clonó en los sitios *EcoRI* / *HindIII* de extremos romos del vector pUC18 vector, dando el plásmido pUC18- Δ *melB*::TT02-SMC.

Después, el casete de resistencia a la kanamicina se amplificó por PCR a partir del vector pKD4 usando los siguientes oligonucleótidos:

Km-F (SEQ ID NO 27)

25 TCCCCCGGGGTATACcatatgaatatcctccttag

con

- una región (minúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko y Wanner (2000)),
- una región (mayúsculas) para los sitios de restricción *SmaI* y *BstZ17I* y bases extra.

30 Km-R (SEQ ID NO 28)

GCCCAAGCTTgtaggctggagctgcttcg

con

- una región (minúsculas) para la amplificación del casete de resistencia a la kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko y Wanner (2000)),
- 35 - una región (mayúsculas) para el sitio de restricción *HindIII* y bases extra.

El fragmento de la PCR se cortó con las enzimas de restricción *BstZ17I* y *HindIII* y se clonó en los sitios *BstZ17I*/*HindIII* del plásmido pUC18- Δ *melB*::TT02-SMC, dando el plásmido pUC 18- Δ *melB*::TT02-SMC::Km.

- Finalmente, el fragmento *Ptrc01*/ARN01/RBS01*2-*pycre*-TT07 se amplificó por PCR con los cebadores *Ptrc01*/ARN01/RBS01*2-*pycre*-F y *pycre*-TT07-R a partir del plásmido pCL1920-*PgapA-pycre*-TT07, descrito en la solicitud de patente WO2012/055798. El fragmento de la PCR se cortó con las enzimas de restricción *AvrII* y *PacI* y se clonó en los sitios *AvrII*/*PacI* del plásmido pUC18- Δ *melB*::TT02-SMC::Km, dando el plásmido pUC18- Δ *melB*::TT02-*Ptrc01*/ARN01/RBS01*2-*pycre*-TT07::Km.
- 40

Los plásmidos recombinantes se verificaron por secuenciación del ADN.

Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-F (SEQ ID NO 29)

cgtagttaacttaattaa**GAGCTGTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGG**
AAGGTGGAGTTATCTCGAGTGAGATATTGTTGACGTAAGGAGGTTATAAATGCC
 CATATCCAAGATACTCGTTGCCAATCG

con

- una región (minúsculas) para el sitio de restricción *PacI* y bases extra,

5 - una región (mayúsculas negrilla) homóloga al promotor *trc* inducible artificial,

- una región (mayúsculas subrayadas) homóloga a una secuencia que estabilizaba el ARNm (Meynial-Salles et al. 2005),

- una región (mayúsculas itálica) homóloga a un sitio de unión al ribosoma optimizado,

- una región (mayúsculas) homóloga al inicio de *pyc* gen de *Rhizobium etli* (1-32).

10 pycre-TT07-R (SEQ ID NO 30)

cgacccgggcctagg**GCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAGTGTGA**gcggccgcT
 CATCCGCCGTAAACCGCCAGCAGG

con

- una región (minúsculas) para los sitios de restricción *SmaI*, *AvrII* y *NotI* y bases extra,

15 - una región (mayúsculas negrilla) para la secuencia del terminador de la transcripción T7te (Harrington et al. 2001), denominada TT07,

- una región (mayúsculas) homóloga al extremo del gen *pyc* de *Rhizobium etli* (3441-3465).

En segundo lugar, se obtuvo el fragmento $\Delta melB::TT02-Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07::Km$ cortando el plásmido pUC18- $\Delta melB::TT02-Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07::Km$ con la enzima de restricción *KpnI* y después se introdujo por electroporación en una cepa MG1655 *metA*11* pKD46, de acuerdo con el protocolo 1. Después, se seleccionaron los transformantes resistentes a la kanamicina y se verificó la inserción del fragmento $\Delta melB::TT02-Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07::Km$ por análisis de PCR con los oligonucleótidos *melB-pycre-F* y *melB-pycre-R*. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA*11* pKD46 $\Delta melB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07::Km$.

melB-pycre-F (SEQ ID NO 31)

25 gccgattttgtcgtgtggc

homóloga a la secuencia (4340168-4340187) de la región *melB* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>)

melB-pycre-R (SEQ ID NO 32)

gccgggttatccatcaggttcac

30 homóloga a la secuencia (4344044-4344065) de la región *melB* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>)

En tercer lugar, se transdujo la modificación cromosómica $\Delta melB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07::Km$ a la cepa 8, con un lisado de fago P1 a partir de la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 $\Delta melB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07::Km$ descrita antes, de acuerdo con el protocolo 2. Se seleccionaron los transductantes resistentes a kanamicina y la presencia de la modificación cromosómica $\Delta melB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07::Km$ se verificó por PCR con los cebadores *melB-pycre-F* y *melB-pycre-R*. La cepa resultante MG1655 *metA*11* *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* $\Delta metJ$ $\Delta pykF$ $\Delta pykA$ $\Delta purU$ $\Delta yncA$ $\Delta malS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE$ $\Delta pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta luxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-PgapA-metA*1$ $\Delta wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$ $\Delta treBC::TT02-serA-serC$ $\Delta melB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07::Km$ se denominó cepa 9.

Después, se eliminó el casete de resistencia a la kanamicina. Se introdujo el plásmido pCP20, que lleva la

recombinasa FLP que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a la kanamicina, en la cepa 9. Después de una serie de cultivos a 37°C, la pérdida del casete de resistencia a la kanamicina se verificó por análisis de PCR con los mismos oligonucleótidos que los usados previamente, melB-pycre-F/melB-pycre-R. La cepa resultante MG1655 *metA**11 *P_{trc}-metH P_{trc}F-cysPUWAM P_{trc}F-cysJIH P_{trc}09-gcvTHP P_{trc}36-ARNmst17-metF P_{trc}07-serB Δ metJ Δ pykF Δ pykA Δ purU Δ yncA Δ malS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-cysE Δ pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-metA*11 Δ uxaCA ::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-metA*11 Δ CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-metA*11 1 Δ wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-metA*11 Δ treBC::TT02-serA-serC Δ melS::RN/P_{trc}01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07 se denominó cepa 10.*

10 2.2. Construcción de las cepas 11 y 12

Para eliminar el gen *purU* y sustituirlo por la región PL1*1/RBS01*2-pycre-TT07, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko y Wanner (2000). Para este fin, se construyó el siguiente plásmido, pUC18- Δ purU::TT02-PL1*1/RBS01*2-pycre-TT07::Km. Este plásmido pUC18- Δ purU::TT02-PL1*1/RBS01*2-pycre-TT07::Km se obtiene del vector pUC18 (Norlander et al., *Gen* 26 (1983), 101-106) y alberga el casete de resistencia a la kanamicina conectado al fragmento PL1*1/RBS01*2-pycre-TT07, ambos clonados entre las regiones en la dirección 5' y la dirección 3' de *purU*.

Para la construcción de pUC18- Δ purU::TT02-PL1*1/RBS01*2-pycre-TT07::Km, primero se construyó el plásmido pUC18- Δ purU::TT02-SMC. Este plásmido lleva las regiones en la dirección 5' y la dirección 3' de *purU* que se separan por un terminador transcripcional (T₁ del gen *rrnB* de *E. coli*, denominado TT02) y un sitio de clonación múltiple (compuesto de los sitios de restricción *Bst*Z17I, *Hind*III, *Pac*I, *Avr*II, *Ap*aI, *Sma*I, *Bam*HI, denominado SMC). Esta última región se amplificó por PCR a partir del ADN genómico usando los siguientes oligonucleótidos:

*purU*up-F (SEQ ID NO 33)

ctgaggcctatgcatGGAATGCAATCGTAGCCACATCGC

con

25 - una región (minúsculas) para los sitios de restricción *Stu*I y *Nsi*I y bases extra,

- una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia (1288424-1288447) de la región *purU* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>).

*purU*up-R (SEQ ID NO 34)

gcttgataacAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTTCGACTGAGCCTTTTCGTT
TTATTTGATGGCTGGAAAAACCTTGTTGAGAGTGTTC

30 con

- una región (minúsculas) para el sitio de restricción *Bst*Z17I y parte del sitio de restricción *Hind*III del sitio de clonación múltiple,

- una región (mayúsculas negrilla) para el terminador de la transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* (Orosz et al. 1991),

35 - una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia (1287849-1287877) de la región *purU* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>).

*purU*down-F (SEQ ID NO 35)

AGACTGGGCCTTTTCGTTTATCTGTTgtatacaagcttaattaacctaggggcctcgccggcgga
tccGGTAATCGAACGATTATCTTTAATCGCC

con

40 - una región (mayúsculas negrilla) para parte del terminador de la transcripción T₁ del gen *rrnB* de *E. coli* (Orosz et al. 1991),

- una región (minúsculas) para el sitio de clonación múltiple entero,

- una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia (1287000-1287028) de la región *purU* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>).

45 *purU*down-R (SEQ ID NO 36)

ctgaggcctatgcatGCGGATTCGTTGGGAAGTTCAGGG

con

- una región (minúsculas) para los sitios de restricción *StuI* y *NsiI* y bases extra,

- una región (mayúsculas) homóloga a la secuencia (1286429-1286452) de la región *purU* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>).

Primero, se amplificaron por PCR los fragmentos "upPurU" y "downPurU" a partir del ADN genómico de MG1655 usando los oligonucleótidos purUup-F/purUup-R y purUdown-F/purUdown-R, respectivamente. En segundo lugar, se amplificó el fragmento "upPurU-downPurU" a partir de los fragmentos de la PCR "upPurU" y "downPurU" (que tienen una región que solapa compuesta de una parte del terminador de la transcripción T₁ del gen *rnnB* de *E. coli* y parte del sitio de clonación múltiple) usando los oligonucleótidos purUup-F/purUdown-R. El fragmento de la PCR "upPurU-downPurU" se cortó con la enzima de restricción *StuI* y se clonó en los sitios *EcoRI/HindIII* de extremos romos del vector pUC18, dando el plásmido pUC18- Δ *purU*::TT02-SMC.

Después, se amplificó por PCR el casete de resistencia a la kanamicina a partir del vector pKD4 usando los oligonucleótidos Km-F y Km-R (descritos antes). El fragmento de la PCR se cortó con las enzimas de restricción *BstZ17I* y *HindIII* y se clonó en los sitios *BstZ17I* / *HindIII* del plásmido pUC18- Δ *purU*::TT02-SMC, dando el plásmido pUC18- Δ *purU*::TT02-SMC::Km.

Finalmente, el fragmento PL1*1/RBS01*2-*pycre*-TT07::Km se amplificó por PCR con los cebadores PL1*1/RBS01*2-*pycre*-F y *pycre*-TT07-R2 a partir del plásmido pCL1920-*PgapA-pycre*-TT07, descrito en la solicitud de patente WO2012/055798. El fragmento de la PCR se cortó con las enzimas de restricción *SpeI* y *SmaI* y se clonó en los sitios *AvrII/SmaI* del plásmido pUC18- Δ *purU*::TT02-SMC::Km, dando el plásmido pUC18- Δ *purU*::TT02-PL1*1/RBS01*2-*pycre*-TT07::Km. Los plásmidos recombinantes se verificaron por secuenciación de ADN.

PL1*1/RBS01*2-*pycre*-F (SEQ ID NO 37)

ctctagaactagt**TTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAAATACCACTGGCGGT****I****ATAC**
TGAGCACAgtcgacgttaacacgcgt**TAAGGAGGTTATAAATGCCCATATCCAAGATACTC**
GTTGCCAATCG

con

- una región (minúsculas) para los sitios de restricción *SpeI*, *SaI*, *HpaI* y *MluI* y bases extra,

- una región (mayúsculas negrilla) homóloga a la forma corta del promotor P_L del bacteriófago lambda (P_L₁ Giladi et al. 1995) y que alberga una mutación en la caja -10 box (G12T, subrayada negrilla) descrita en Kincade y deHaseth (1991). Este promotor se denomina PL1*1,

- una región (mayúsculas itálica) homóloga a un sitio de unión del ribosoma optimizado,

- una región (mayúsculas) homóloga al inicio 5' del gen *pyc* de *Rhizobium etli* (1-32).

pycre-TT07-R2 (SEQ ID NO 38)

tcgagcccggg**GCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAG**tacgtaagtactttaattaa**TCA**
TCCGCCGTAAACCGCCAG

con

- una región (minúsculas) para los sitios de restricción *SmaI*, *PacI*, *SalI*, *SnaBI* y bases extra,

- una región (mayúsculas negrilla) para la secuencia del terminador transcripcional T7te (Harrington et al. 2001),

- una región (mayúsculas) homóloga al extremo 5' del gen *pyc* de *Rhizobium etli* (3445-3465).

En segundo lugar, se obtuvo el fragmento Δ *purU*::TT02-PL1*1/RBS01*2-*pycre*-TT07::Km cortando el plásmido pUC18- Δ *purU*::TT02-PL1*1/RBS01*2-*pycre*-TT07::Km con la enzima de restricción *NsiI* y después se introdujo por electroporación, de acuerdo con el protocolo 1, en la cepa MG1655 *metA**11 pKD46. Después, se seleccionaron los transformantes resistentes a la kanamicina, y la inserción del fragmento Δ *purU*::TT02-PL1*1/RBS01*2-*pycre*-TT07::Km se verificó por un análisis de PCR con los oligonucleótidos purU-*pycre*-F y purU-*pycre*-R. La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 *metA**11 pKD46 Δ *purU*::RN/PL1*1/RBS01*2-*pycre*-TT07::Km.

purU-*pycre*-F (SEQ ID NO 39)

GCCCACCAGCGAACCAATTG

homóloga a la secuencia (1288589-1288608) de la región *purU* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>)

purU-pycre-R (SEQ ID NO 40)

5 GTAAACGTGGTGCCATCGGG

homóloga a la secuencia (1285868-1285887) de la región *purU* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>).

En tercer lugar, se transdujo la modificación cromosómica $\Delta purU::RN/PL1^*/RBS01^*2-pycre-TT07::Km$ en la cepa 10, con un lisado de fago P1 desde la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 $\Delta purU::RN/PL1^*/RBS01^*2-pycre-TT07::Km$ descrita antes, de acuerdo con el protocolo 2. Los transductantes resistentes a la kanamicina se seleccionaron y la presencia de la modificación cromosómica $\Delta purU::RN/PL1^*/RBS01^*2-pycre-TT07::Km$ se verificó por PCR con los cebadores *purU-pycre-F* y *purU-pycre-R*. La cepa resultante MG1655 *metA*11* *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* $\Delta metJ$ $\Delta pykF$ $\Delta pykA$ $\Delta purU$ $\Delta yncA$ $\Delta malS::TTadc-CI857-PlambdaR^*(-35)-thrA^*1-cysE$ $\Delta pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta treBC::TT02-serA-serC$ $\Delta melB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01^*2-pycre-TT07$ **$\Delta purU::RN/PL1^*/RBS01^*2-pycre-TT07::Km$** se denominó cepa 11.

Después se eliminó el casete de resistencia a la kanamicina. El plásmido pCP20, que llevaba la recombinasa FLP que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a la kanamicina, se introdujo en la cepa 11. Después de una serie de cultivos a 37°C, la pérdida del casete de resistencia a la kanamicina se verificó por análisis de PCR con los mismos oligonucleótidos usados previamente, *purU-pycre-F* / *purU-pycre-R*. La cepa resultante MG1655 *metA*11* *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* $\Delta metJ$ $\Delta pykF$ $\Delta pykA$ $\Delta purU$ $\Delta yncA$ $\Delta malS::TTadc-CI857-PlambdaR^*(-35)-thrA^*1-cysE$ $\Delta pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta treBC::TT02-serA-serC$ $\Delta melB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01^*2-pycre-TT07$ **$\Delta purU::RN/PL1^*/RBS01^*2-pycre-TT07$** se denominó cepa 12.

3. Construcción de las cepas 13 y 14

30 Para aumentar el conjunto de metileno-tetrahidrofolato en la célula, se llevó a cabo la sobreproducción del complejo de escisión de glicina codificado por el operón *gcvTHP* por adición de una copia de este operón en el cromosoma en el locus *yjbl*. Esta copia adicional de *gcvTHP* se expresó usando el promotor *trc* inducible artificial, y un sitio de unión al cromosoma optimizado, dando la integración del cromosoma $\Delta yjbl::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km$, descrito en la solicitud de patente PCT/FR2012 /051361.

35 La modificación cromosómica $\Delta yjbl::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km$ se transdujo en la cepa 12, con un lisado de fago P1 a partir de la cepa MG1655 *metA*11* pKD46 $\Delta yjbl::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km$, descrita en la solicitud de patente PCT/FR2012 /051361, de acuerdo con el protocolo 2. Los transductores resistentes a la kanamicina se seleccionaron y la presencia de la modificación cromosómica $\Delta yjbl::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km$ se verificó por PCR con los cebadores *yjbl-gcvTHP-F* y *yjbl-gcvTHP-R*, descritos en la solicitud de patente PCT/FR2012/051361. La cepa resultante MG1655 *metA*11* *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* $\Delta metJ$ $\Delta pykF$ $\Delta pykA$ $\Delta purU$ $\Delta yncA$ $\Delta malS::TTadc-CI857-PlambdaR^*(-35)-thrA^*1-cysE$ $\Delta pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta treBC::TT02-serA-serC$ $\Delta melB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01^*2-pycre-TT07$ $\Delta purU::RN/PL1^*/RBS01^*2-pycre-TT07$ **$\Delta yjbl::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07::Km$** se denominó cepa 13.

Después, se eliminó el casete de resistencia a la kanamicina. Se introdujo el plásmido pCP20, que llevaba la recombinasa FLP que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a la kanamicina, en la cepa 13. Después de una serie de cultivos a 37°C, la pérdida del casete de resistencia a la kanamicina se verificó por análisis de PCR con los mismos oligonucleótidos usados previamente, *yjbl-gcvTHP-F* y *yjbl-gcvTHP-R*. La cepa resultante MG1655 *metA*11* *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* $\Delta metJ$ $\Delta pykF$ $\Delta pykA$ $\Delta purU$ $\Delta yncA$ $\Delta malS::TTadc-CI857-PlambdaR^*(-35)-thrA^*1-cysE$ $\Delta pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta uxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR^*(-35)-RBS01-thrA^*1-cysE-PgapA-metA^*11$ $\Delta treBC::TT02-serA-serC$ $\Delta melB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01^*2-pycre-TT07$ $\Delta purU::RN/PL1^*/RBS01^*2-pycre-TT07$ **$\Delta yjbl::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07$** se denominó cepa 14.

4. Construcción de la cepa 15

Para aumentar el flujo en la ruta de serina, se introdujo el plásmido pCC1BAC-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca, descrito en la solicitud de patente **PCT/FR2012/051361**, en la cepa 14, dando la siguiente cepa MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::TTadC-CI857-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-cysE Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ *uxaCA*::TT07-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ CP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ wcaM::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ treBC::TT02-serA-serC Δ meI/B::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07 Δ purU::RN/PL1*1/RBS01*2-pycre-TT07 Δ yjbl::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07 (**pCC1BAC-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca**), denominada cepa 15.

Ejemplo 7: Construcción de las cepas 16 y 17

1. Construcción de la cepa 16

Para aumentar la importación de glucosa en la célula, se eliminó el gen *dgsA* (o *mlc*), que codifica un regulador doble transcripcional que controla la expresión de una serie de genes que codifican enzimas del sistema de fosfotransferasa de azúcar dependiente de PEP (PTS) de *Escherichia coli*.

Para eliminar el gen *dgsA*, se usó la cepa de *Escherichia coli* BW25113 Δ *dgsA*::Km de la colección de mutantes Keio (Baba et al., 2006). La eliminación de Δ *dgsA*::Km se transfirió por la transducción del fago P1 (de acuerdo con el protocolo 2) de la cepa BW25113 Δ *dgsA*::Km a la cepa 14. Se seleccionaron los transductantes resistentes a la kanamicina y la presencia de la eliminación cromosómica Δ *dgsA*::Km se verificó por PCR con los cebadores *dgsA*-F y *dgsA*-R definidos más adelante.

La cepa retenida MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::TTadC-CI857-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-cysE Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ *uxaCA*::TT07-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ CP4-6::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ wcaM::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-cysE-PgapA-*metA**11 Δ treBC::TT02-serA-serC Δ meI/B::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycre-TT07 Δ purU::RN/PL1*1/RBS01*2-pycre-TT07 Δ yjbl::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP-TT07 **Δ dgsA::Km** se denominó cepa 16.

dgsA-F (SEQ ID NO 41)

CCTGGCAAATAACCCGAATG

homóloga a la secuencia (1667067-1667086) de la región *dgsA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>)

dgsA-R (SEQ ID NO 42)

CCCATTGAGAGAGTGGACGC

homóloga a la secuencia (1664853- 1664872) de la región *dgsA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>).

2. Construcción de la cepa 17

Otra forma de aumentar la importación de glucosa en la célula consiste en la sobreproducción de PtsG (IIC^{Glc}), la pareja transmembrana del sistema de fosfotransferencia de glucosa. Con el fin de sobreexpresar *ptsG* en el contexto de la cepa 15, se construyó el siguiente plásmido, pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca.

El plásmido pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca se obtiene del plásmido pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07 (descrito antes en el ejemplo 1, construcción de la cepa 2) y del plásmido pCC1BAC-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca, descrito en la solicitud de patente **PCT/FR2012/051361**. El fragmento *Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca* se cortó con las enzimas de restricción *Sna*BI y *Avr*II a partir del plásmido pCC1BAC-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca y se clonó en el sitio *Pac*I de extremo romo del plásmido pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07, dando plásmido pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca.

Después, el plásmido pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca se introdujo en la cepa 16, dando la siguiente MG1655 *metA**11 *Ptrc-metH* *PtrcF-cysPUWAM* *PtrcF-cysJIH* *Ptrc09-gcvTHP* *Ptrc36-ARNmst17-metF* *Ptrc07-serB* Δ *metJ* Δ *pykF* Δ *pykA* Δ *purU* Δ *yncA* Δ *malS*::TTadC-CI857-PlambdaR*(-35)-*thrA**1-cysE Δ *pgaABCD*::TT02-TTadC-PlambdaR*(-35)-RBS01-*thrA**1-

*cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔtreBC::TT02-serA-serC ΔmelB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycr- TT07 ΔpurU::RN/PL1*1/RBS01*2-pycr- TT07 ΔyjbI::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP- TT07 ΔdgsA::Km (pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca),*
denominada cepa 17.

En este plásmido pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07, el promotor natural del gen *ptsG* así como el sitio de unión al ARN pequeño *sgrS* se sustituyen por un promotor artificial fuerte (construcción descrita en el ejemplo 1 anterior). Por consiguiente, *ptsG* es sobreexpresado y su ARNm ya no está regulado y está activado para la degradación por *sgrS*.

La sobreexpresión del gen *ptsG* gen en la cepa 17 cultivada en condiciones inducibles (+IPTG en el cultivo) se comprobó por qPCR.

Ejemplo 8: Construcción de la cepa 18

La cepa 18 alberga una versión modificada del plásmido pCC1BAC-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca (que se describió en la solicitud de patente **PCT/FR2012/051361**), que significa que se intercambió el gen de resistencia al cloranfenicol de pCC1BAC-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca por un gen de resistencia a la gentamicina, dando el plásmido pCC1BACVB01-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca.

Para intercambiar el gen de resistencia al antibiótico del plásmido pCC1BAC-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca, se usó el mismo procedimiento descrito antes para la construcción del plásmido pCC1BACVB01-PlacIq-lacI-TT02-Ptrc01/OP01/RBS01*2-ptsG-TT07.

Después, el plásmido pCC1BACVB01-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca se introdujo en la cepa 16 dando la cepa MG1655 *metA*11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Ptrc07-serB ΔmetJ ΔpykF ΔpykA ΔpurU ΔyncA ΔmalS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE ΔpgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔuxaCA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔCP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔwcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11 ΔtrBC::TT02-serA-serC ΔmelB::RN/Ptrc01/ARN01/RBS01*2-pycr- TT07 ΔpurU::RN/PL1*1/RBS01*2-pycr- TT07 ΔyjbI::RN/Ptrc01/RBS01-gcvTHP- TT07 ΔdgsA::Km (pCC1BACVB01-TT02-Ptrc30/RBS01-serC-TT07*2-Ptrc30/RBS01-serA-TTadcca),*
denominada cepa 18.

Ejemplo 9: Producción de L-metionina por fermentación en matraces con agitación

La producción de las cepas se evaluó en matraces Erlenmeyer pequeños. Un precultivo de 5,5 ml se cultivó a 30°C durante 21 horas en un medio mixto (medio LB al 10% (Sigma 25%) con glucosa 2,5 g.l⁻¹ y medio mínimo PC1 al 90%). Se usó para inocular un cultivo de 50 ml de medio PC1 (tabla 2) a una DO₆₀₀ de 0,2. Cuando era necesario se añadieron los antibióticos a una concentración de 50 mg.l⁻¹ para le estreptomycin, a una concentración de 30 mg.l⁻¹ para el cloranfenicol y a una concentración de 10 mg.l⁻¹ para la gentamicina. Se añadió IPTG a los cultivos con diferentes concentraciones indicadas en cada ejemplo. La temperatura de los cultivos era 37°C. Cuando el cultivo había alcanzado una DO₆₀₀ de 5 a 7, los aminoácidos extracelulares se cuantificaron por HPLC después de derivatización con OPA/Fmoc y otros metabolitos relevantes se analizaron usando HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa) y GC-MS después de sililación. Para cada cepa se hicieron varias repeticiones.

El rendimiento de metionina se expresó como sigue:

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

Tabla 2: Composición de medio mínimo (PC1):

Compuesto	Concentración (g.l ⁻¹)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200

CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080
H ₃ BO ₃	0,0010
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0004
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00
Ácido cítrico	6,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04
K ₂ HPO ₄	8,00
Na ₂ HPO ₄	2,00
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8,00
NH ₄ Cl	0,13
NaOH 4 M	Ajustado a pH 6,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,04
Tiamina	0,01
Glucosa	15,00
Tiosulfato amónico	5,60
Vitamina B12	0,01
MOPS	15,00

Efecto de la sobreexpresión de *ptsG* en la producción de metionina en diferentes cepas

5 Tabla 3: Rendimientos de metionina, cetometilvalerato y homolantionina (Y_{Met} , Y_{KMV} , Y_{HLA}) en % de g de producto/g de glucosa, producido en cultivo discontinuo por la cepa 2. Para la definición precisa de rendimiento de metionina/glucosa véase antes. Para cada una de las condiciones se hicieron dos repeticiones. Las concentraciones de HLA y KMV se midieron solo para un matraz. El IPTG (abreviatura de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) induce la transcripción del promotor lac del plásmido pCC1BACVB01-*PlacIq-lacI*-TT02-*Ptrc01*/OP01/RBS01*2-*ptsG*-TT07 que lleva la cepa 2 (véase el genotipo en el ejemplo 1).

Concentración de IPTG (μ M)	Y_{Met}	Y_{KMV}	Y_{HLA}
0	9,86 $\pm$ 0,67	0,87	3,78
10	11,90 $\pm$ 0,17	0,35	3,55
20	13,32 $\pm$ 0,14	0,18	3,48
200	12,80 $\pm$ 0,37	0,13	3,66

10 Como se puede ver en la tabla 3, el rendimiento de la producción de metionina aumenta significativamente tras la expresión de *ptsG*. La mejor inducción de *ptsG* se obtiene con IPTG 20 μ M (comprobado por qPCR, no se muestran los datos) y la mejor producción de metionina también se obtiene en dichas condiciones. Además, la sobreproducción de *ptsG* permite disminuir la acumulación de cetometilvalerato en el cultivo.

15 Como información, la cepa de control 1 cultivada en matraces da un rendimiento de la producción de metionina equivalente al rendimiento obtenido con la cepa 2 sin IPTG.

Tabla 4: Rendimientos de metionina, cetometilvalerato y homolantionina (Y_{Met} , Y_{KMV} , Y_{HLA}) en % de g de producto/g de glucosa, producido en cultivo discontinuo por las cepas 3 y 4. Para la definición precisa de rendimientos véase antes. El número de repeticiones se indica entre paréntesis. La cepa 4 se cultivó con IPTG 20 μ M para inducir la expresión de *ptsG*.

20

Cepa	Y_{Met}	Y_{KMV}	Y_{HLA}
Cepa 3 (N = 27)	$9,95 \pm 1,40$	$1,22 \pm 0,32$	$2,87 \pm 1,21$
Cepa 4 (N = 3)	$9,86 \pm 0,10$	0,17	1,99

- La sobreexpresión de *ptsG* en la cepa 4, que tiene la expresión de transhidrogenasa modificada (sobreexpresión de *pntAB* y eliminación de *udhA*) permite la reducción de la producción de homolantionina y cetometilvalerato. En dicho contexto, la sobreexpresión de *ptsG* no potencia el rendimiento de producción de metionina, pero mejora claramente la pureza del producto final.

Esto muestra que no era fácil predecir el efecto de una mayor importación de glucosa en cepas productoras de metionina.

Efecto de la eliminación de *sgrS* y *sgrT* en la producción de metionina

- Tabla 5: Rendimientos de metionina, cetometilvalerato y homolantionina (Y_{met} , Y_{KMV} , Y_{HLA}) en % de g de producto/g de glucosa, producido en cultivo discontinuo por las cepas 1 y 5. Para la definición precisa de rendimientos véase antes. El número de repeticiones se indica entre paréntesis.

Cepa	Y_{met}	Y_{KMV}	Y_{HLA}
Cepa 1 (N = 283)	$10,42 \pm 1,87$	$1,22 \pm 0,42$	$3,25 \pm 0,91$
Cepa 5 (N = 3)	$14,03 \pm 0,26$	1,92	3,01

- Como puede verse en la tabla 5 anterior, el rendimiento de metionina aumenta significativamente tras la eliminación de los genes *sgrS* y *sgrT*.

SgrS inhibe la traducción del ARNm de *ptsG* tanto directa como indirectamente. El extremo 5' de *SgrS* contiene un marco de lectura abierto de 43 aminoácidos, *sgrT*, que regula la actividad de *PtsG*.

En la cepa 5 se eliminan tanto los genes *sgrS* como *sgrT* y el efecto en la producción de metionina es positivo y similar al efecto obtenido con una sobreproducción de *ptsG* (véase la tabla 3).

- Ejemplo 10: Producción de L-metionina por fermentación en biorreactores con las cepas 1 y 2

Las cepas que produjeron en matraces cantidades sustanciales de metabolitos de interés, posteriormente se ensayaron en condiciones de producción de fermentadores de 2,5 litros (Pierre Guerin) usando un procedimiento semicontinuo.

- Se usó un cultivo de 24 horas cultivado en 10 ml de medio LB con glucosa $2,5 \text{ g.l}^{-1}$ para inocular un precultivo de 24 horas en medio mínimo (B1a). Estas incubaciones se llevaron a cabo en matraces con deflectores de 500 ml que contenían 50 ml de medio mínimo (B1a) en un agitador rotatorio (200 rpm). El primer precultivo se cultivó a una temperatura de 30°C , el segundo a una temperatura de 34°C .

- Se llevó a cabo una tercera etapa de precultivo en biorreactores (Sixfors) cargados con 200 ml de medio mínimo (B1b) inoculado con una concentración de biomasa de $1,2 \text{ g.l}^{-1}$ con 5 ml de precultivo concentrado. La temperatura del precultivo se mantuvo constante a 34°C y el pH se ajustó automáticamente a un valor de 6,8 usando una solución de NH_4OH al 10%. La concentración de oxígeno disuelto se ajustó continuamente a un valor de 30% de la saturación de la presión parcial del aire con suministro de aire y/o agitación. Tras agotarse la glucosa del medio discontinuo, se inició la fase semicontinua con un caudal inicial de $0,7 \text{ ml.h}^{-1}$ y se aumentó exponencialmente durante 24 horas con una velocidad de crecimiento de $0,13 \text{ h}^{-1}$ con el fin de obtener una concentración celular final de aproximadamente 20 g.l^{-1} .

Tabla 6: Composición del medio mineral de precultivo discontinuo (B1a y B1b).

Compuesto	Concentración de B1a (g.l^{-1})	Concentración de B1b (g.l^{-1})
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0130	0,0130
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0015	0,0015
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	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
Citrato de Fe(III) H ₂ O	0,1064	0,1064
EDTA	0,0084	0,0084
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00	1,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,08	0,08
Ácido cítrico	1,70	1,70
KH ₂ PO ₄	4,57	4,57
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	2,50	2,50
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,10	1,10
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,90	4,90
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	1,00	1,00
Tiamina	0,01	0,01
Vitamina B12	0,01	0,01
Glucosa	30,00	5,00
MOPS	30,00	0,00
NH ₄ OH 28%	Ajustado a pH 6,8	Ajustado a pH 6,8

Tabla 7: Composición de medio mineral de precultivo semicontinuo (F1)

Compuesto	Concentración (g.l ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	0,0104
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0012
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0120
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0020
H ₃ BO ₃	0,0024
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0020
Citrato de Fe(III) H ₂ O	0,0424
EDTA	0,0067
MgSO ₄	5,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,30
Na ₂ SO ₄	8,90
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	24,80
Tiamina	0,01
Glucosa	500,00
Vitamina B12	0,01

NH ₄ OH 28%	Ajustado a pH 6,8
------------------------	-------------------

Tabla 8: Composición de medio mineral de cultivo discontinuo (B2)

Compuesto	Concentración (g.l ⁻¹)
Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	0,0130
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,0015
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,0150
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0025
H ₃ BO ₃	0,0030
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0025
Citrato de Fe(III) H ₂ O	0,1064
EDTA	0,0084
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,08
Ácido cítrico	1,70
KH ₂ PO ₄	2,97
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,65
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,72
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	3,74
Tiamina	0,01
Vitamina B12	0,01
Biotina	0,10
Glucosa	10
NH ₄ OH 28%	Ajustado a pH 6,8

Tabla 9: Composición de medio de cultivo semicontinuo (F2)

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
EDTA	0,0067
MgSO ₄	5,00

(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	55,50
Tiamina	0,01
Vitamina B12	0,01
Biotina	0,10
Glucosa	500

Posteriormente, los fermentadores de 2,5 litros (Pierre Guerin) se cargaron con 600 ml de medio mínimo (B2) y se inocularon a una concentración de biomasa de 2,1 g.l⁻¹ con un volumen de precultivo en el intervalo entre 55 y 70 ml.

5 La temperatura del cultivo se mantuvo constante 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 9 horas y 28% hasta el final del cultivo). La velocidad de agitación inicial se ajustó a 200 rpm durante la fase discontinua y se aumentó hasta 1000 rpm durante la fase semicontinua. El caudal de aire inicial se ajustó a 40 NI.h⁻¹ durante la fase discontinua y se aumentó a 100 NI.h⁻¹ al comienzo de la fase semicontinua. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en valores entre 20 y 40%, preferiblemente 30% de saturación, aumentando la agitación.

10 Cuando la masa celular alcanzó una concentración cercana a 5 g.l⁻¹, se inició la fase semicontinua con un caudal inicial de 5 ml.h⁻¹. La disolución de alimentación se inyectó durante 14 horas con un perfil sigmoideo con un caudal creciente que alcanzó 27 ml.h⁻¹ después de 26 horas. Las condiciones de alimentación precisas se calcularon mediante la siguiente ecuación:

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

15 donde Q(t) es el caudal de alimentación en ml.h⁻¹ para un volumen de lote de 600 ml.

Para 14 hora, los parámetros eran: p1 = 1,80, p2 = 22,40, p3 = 0,27, p4 = 6,50 y después desde las 14 h a las 26 horas, los parámetros eran p1 = 2,00, p2 = 25,00, p3 = 0,40, p4 = 9,00.

Después de 26 horas de fase semicontinua, se detuvo el bombeo de la disolución de alimentación y el cultivo se detuvo tras agotarse la glucosa.

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

25 Tabla 10: Rendimientos de metionina (Y_{Met}) en % de g de metionina por g de glucosa, producida en cultivo semicontinuo por la cepa 2 y cepa 1. La cepa 2 se cultivó usando diferentes concentraciones de IPTG. Para la definición del rendimiento de metionina/glucosa véase más adelante. DE indica la desviación estándar para los rendimientos que se calcularon basándose en varias repeticiones (N = número de repeticiones)

Cepa	Condiciones	Y _{Met}
Cepa 1	No IPTG (N = 34)	22,06 ± 1,02
Cepa 2	IPTG 20 µM en medio discontinuo - IPTG 20 µM en medio semicontinuo (N = 2)	24,13 ± 2,31
Cepa 2	IPTG 20 µM en medio discontinuo - IPTG 80 µM en medio semicontinuo (N = 1)	23,11

30 Como puede verse en la tabla 10, independientemente de la concentración de IPTG aplicada durante el cultivo de la cepa 2, la sobreexpresión de *ptsG* mejora significativamente la producción de metionina. Una sobreexpresión constitutiva del gen *ptsG* en la cepa 2 (condiciones de inducción: IPTG 20 µM en medio discontinuo - IPTG 20 µM en medio semicontinuo) son las mejores condiciones para potenciar el rendimiento de la metionina.

La inducción de la expresión de *ptsG* se comprobó por qPCR. Los niveles de ARNm de *ptsG* eran mucho mayores en las cepas 2 y 3 con IPTG que en la cepa de control 1. Véanse los resultados en la figura 1.

35 Tras la sobreexpresión de *ptsG*, la cepa 2 no acumula glucosa durante el cultivo ni al final del mismo. Al contrario, la cepa 1 que tenía una importación de glucosa de tipo natural, muestra una fuerte acumulación de glucosa después de 25 h de cultivo. La concentración de glucosa residual alcanza más de 10 g/l para la cepa 1 y menos de 3 g/l con la cepa 2.

La mejora de la importación de glucosa no solo mejora la producción de metionina, sino que también mejora la

pureza del producto.

El volumen del reactor se calculó añadiendo al volumen inicial la cantidad de disoluciones añadidas para regular el pH y para alimentar el cultivo y restando el volumen usado para la toma de muestras y la pérdida por evaporación.

- 5 El volumen de la fase discontinua se siguió continuamente pesando la materia prima alimentada. La cantidad de glucosa inyectada después se calculó basándose en el peso inyectado, la densidad de la disolución y la concentración de glucosa determinada por el método de Brix ([Glucosa]). El rendimiento de metionina se expresó como sigue:

$$Y_{met} = \frac{Metionina_t * V_t - Metionina_0 * V_0 \times 100}{Glucosa consumida e_t}$$

- 10 El rendimiento máximo obtenido durante el cultivo se presentó para cada cepa.

Siendo Metionina₀ y Metionina_t respectivamente las concentraciones inicial y final de metionina, y V₀ y V_t los volúmenes inicial y en el momento t.

La glucosa consumida se calculó como sigue:

$$Volumen alimentado_t = \frac{Peso alimentado_0 - Peso alimentado_t}{Densidad de la disolución de alimentación}$$

- 15 Glucosa inyectada_t = volumen alimentado_t * [Glucosa]
 Glucosa consumida_t = [Glucosa]₀ * V₀ + Glucosa inyectada - [Glucosa]_{residual} * V_t
 Siendo [Glucosa]₀, [Glucosa], [Glucosa]_{residual} respectivamente las concentraciones de glucosa inicial, la alimentada y la residual.

- 20 Ejemplo 11

Producción de L-metionina por fermentación en biorreactor con las cepas 15, 17 y 18

Las condiciones de precultivo se han descrito antes (ejemplo 10).

- 25 Posteriormente, fermentadores de 2,5 litros (Pierre Guerin) se cargaron con 600 ml de medio mínimo (B2) y se inocularon a una concentración de biomasa de 2,1 g.l⁻¹ con un volumen de precultivo en el intervalo entre 55 y 70 ml. La concentración de fosfato final en el medio discontinuo B2 se ajustó a un valor comprendido entre 0 y 20 mM.

- 30 La temperatura del cultivo se mantuvo constante 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 9 horas y 28% hasta el final del cultivo). La velocidad de agitación inicial se ajustó a 200 rpm durante la fase discontinua y se aumentó hasta 1000 rpm durante la fase semicontinua. El caudal de aire inicial se ajustó a 40 NI.h⁻¹ durante la fase discontinua y se aumentó a 100 NI.h⁻¹ al comienzo de la fase semicontinua. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en valores entre 20 y 40%, preferiblemente 30% de saturación, aumentando la agitación. Se añadió IPTG al medio discontinuo y semicontinuo cuando era necesario en una concentración final 20 µM. Cuando era necesario se añadieron antibióticos en una concentración de 50 mg.l⁻¹ para la kanamicina, 30 mg.l⁻¹ para el cloranfenicol y 10 mg.l⁻¹ para la gentamicina.

- 35 Cuando la masa celular alcanzó una concentración cercana a 5 g.l⁻¹, se inició la fase semicontinua con un caudal inicial de 5 ml.h⁻¹. La concentración final de fosfato del medio F2 se ajustó a un valor comprendido entre 5 y 30 mM para alcanzar una limitación de fosfato durante el cultivo. La disolución de alimentación se inyectó con un perfil sigmoideo con un caudal creciente que alcanzó 27 ml.h⁻¹ después de 26 horas. Las condiciones de alimentación precisas se calcularon mediante la ecuación:

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

- 40 donde Q(t) es el caudal de alimentación en ml.h⁻¹ para un volumen de lote de 600 ml, con p1 = 1,80, p2 = 22,4, p3 = 0,27, p4 = 6,50. Este caudal se aumentó de 10 a 50% preferiblemente 30% a lo largo de todo el cultivo.

Después de 26 horas de fase semicontinua, se detuvo el bombeo de la disolución de alimentación y el cultivo se detuvo tras agotarse la glucosa.

Los aminoácidos extracelulares se cuantificaron por HPLC después de derivatización con OPA/Fmoc y otros

metabolitos relevantes se analizaron usando HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa) y GC-MS después de sililación.

Tabla 11: Tasa específica de consumo de glucosa (q_s), rendimientos de metionina máximo y final producida en el cultivo semicontinuo por las cepas 17 y 18. Los rendimientos de las cepas se comparan con la cepa de referencia 15. El símbolo ~ indica un aumento del parámetro menor de 5%, mientras que el símbolo + indica una mejora mayor de 5%.

Cepa	Cepa 15	Cepa 17	Cepa 18
Número de repeticiones	n = 1	n = 4	n = 2
q_s (mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹)	referencia	+	+
Rendimiento de metionina máximo (g.g ⁻¹)	referencia	~	+
Rendimiento de metionina final (g.g ⁻¹)	referencia	+	~

La tasa específica de consumo de glucosa (q_s) aumentó tras la eliminación del gen *dgsA* asociado o no a la sobreexpresión de *ptsG*. Además, los rendimientos de la producción de metionina (tanto máximo como final) aumentaron con estas modificaciones genéticas.

Para las definiciones de rendimientos de metionina, véase el ejemplo 10 anterior.

La tasa específica de consumo de glucosa (q_s) se calculó como sigue:

$$q_s = \frac{glc\ consumida_t - glc\ consumida_{t-1}}{(t - (t-1)) \times [X]_t}$$

donde [X] era la concentración celular en el tiempo t.

Referencias:

1. Plumbridge J (1998), *Mol Microbiol.* 29: 1053-1063
2. Kimata K, Inada T, Tagami H, Aiba H (1998), *Mol Microbiol.* 29: 1509-1519
3. Rungrassamee W, Liu X, Pomposiello PJ (2008), *Arch Microbiol.* 190: 41-49
4. Anderson EH (1946), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128
5. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H (2006), *Mol Syst Biol.* 2: 2006.0008
6. Datsenko KA, Wanner BL (2000), *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 6640-6645
7. Dennis JJ, Zylstra GJ (1998), *Appl Environ Microbiol.* 64: 2710-2715
8. Giladi H, Goldenberg D, Koby S, Oppenheim AB (1995), *FEMS Microbiol Rev.* 17: 135-140
9. Görke B, Vogel J (2008), *Genes Dev.* 22:2914-25
10. Harrington KJ, Laughlin RB, Liang S (2001), *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 5019-5024
11. Kadner RJ, Murphy GP, Stephens CM (1992), *J Gen Microbiol.* 138: 2007-2014
12. Kincade JM, deHaseth PL (1991), *Gene.* 97: 7-12
13. Kornberg HL, Reeves RE (1972), *Biochem J.* 128: 1339-1344
14. Lee AT, Cerami A (1987), *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 8311-8314
15. Meadow ND, Fox DK, Roseman S (1990), *Annu Rev Biochem.* 59: 497-542
16. Meynial-Salles I, Cervin MA, Soucaille P (2005), *Appl Environ Microbiol.* 71: 2140-2144
17. 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

18. Morita T, Aiba H (2007), *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 20149-20150
19. Natarajan A, Sienk F (1999), *Metab Eng*. 1: 320-333
20. Orosz A, Boros I, Venetianer P (1991), *Eur J Biochem*. 201: 653-659
21. Plumbridge J (2002), *Curr Opin Microbiol*. 5: 187-193
- 5 22. Prescott et al. (1999), "Microbiology" 4ª Edición, WCB McGraw-Hill
23. Rohwer JM, Jensen PR, Shinohara Y, Postma PW, Westerhoff HV (1996), *Eur J Biochem*. 235:225-30
24. Sambrook et al. (1989) (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2ª y 3ª Ediciones, Cold Spring Harbor Laboratory Press
25. Sauderson CL (1985), *Br J Nutr*. 54: 621-633
- 10 26. Tchieu JH, Norris V, Edwards JS, Saier MH Jr (2001), *J Mol Microbiol Biotechnol*. 3: 329-346

Lista de secuencias

	<110> METABOLIC EXPLORER DISCHERT, Wanda FIGGE, Rainer	
5	<120> Un microorganismo para la producción de metionina con importación de glucosa mejorada	
	<130> D29769	
	<150> EP11305829	
	< 151> 2011-06-29	
10	<150> US61502528	
	< 151> 2011-06-29	
	<160> 42	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	< 211> 34	
	< 212> ADN	
	< 213> secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
20	<400> 1	
	ccggaattcc atttacgttg acaccatcga atgg	34
	<210> 2	
	< 211> 108	
	< 212> ADN	
	< 213> secuencia artificial	
25	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 2	
	gattaattgt caacagctcc gtagctagca acagataaaa cgaaaggccc agtctttcga	60
	ctgagccttt cgttttattt gatgtacgtc actgcccgct ttccagtc	108
30	<210> 3	
	< 211> 125	
	< 212> ADN	
	< 213> secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
35	<400> 3	
	cgttttatct gttgctagct acggagctgt tgacaattaa tcatccggct cgtataatgt	60
	gtggaattgt gagcggataa caatttcacc taggtaagga ggttataaat ggaatctgat	120
	gaaag	125
	<210> 4	
	< 211> 50	
	< 212> ADN	
40	< 213> secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 4	
	ccagaattcg gcccgggcgg ccttaattaa gcagaaaggc ccacccgaag	50

	<210> 5		
	< 211> 63		
	< 212> ADN		
	< 213> secuencia artificial		
5	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 5		
	ccaaggaaaa gcggccgcc taggtaagga ggttataaat gtttaagaat gcatttgcta	60	
	acc	63	
10	<210> 6		
	< 211> 33		
	< 212> ADN		
	< 213> secuencia artificial		
	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
15	<400> 6		
	gacgtatact tagtggttac ggatgtactc atc	33	
	<210> 7		
	< 211> 140		
	< 212> ADN		
20	< 213> secuencia artificial		
	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 7		
	ccgcttatta tcacttattc aggcgtagca accaggcggt taagggcacc aataactgcc	60	
	ttaaaaaat taggtggcgg tacttgggtc gatatcaaag tgcatactt cttcccgtat	120	
	gcccacttt gtatagagag	140	
25	<210> 8		
	< 211> 140		
	< 212> ADN		
	< 213> secuencia artificial		
	<220>		
30	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 8		
	tgaaataaga tcactaccgg gcgtattttt tgagttatcg agattttcag gagctaagga	60	
	agctaaaatg ttacgcagca gcaacgatgt tacgcagcag ggcagtcgcc ctaaaacaaa	120	
	gttaggtggc tcaagtatgg	140	
35	<210> 9		
	< 211> 23		
	< 212> ADN		
	< 213> secuencia artificial		
	<220>		
40	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 9		
	ggacgcaaaa agaaacgcca gtg	23	
	<210> 10		
	< 211> 51		
45	< 212> ADN		
	< 213> secuencia artificial		

ES 2 654 589 T3

	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 10 gtcattatcc agatcatatcg ttccctttt aaactgacgc atggggcacc c	51
5	<210> 11 < 211> 60 < 212> ADN < 213> secuencia artificial	
10	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 11 gaagcaaggg ggtgccccat gcgtcagttt aaaaagggaa cgtatgatct ggataatgac	60
15	<210> 12 < 211> 53 < 212> ADN < 213> secuencia artificial	
	<220> < 223> Oligonucleótido	
20	<400> 12 ggaataggaa ctaaggagga tattcatatg tcaaacgtct ttaaccttg cg	53
	<210> 13 < 211> 61 < 212> ADN < 213> secuencia artificial	
25	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 13 gcattatttt taaccgcaaa ggttaaagac gtttgacata tgaatatacct ccttagttcc	60
	t	61
30	<210> 14 < 211> 140 < 212> ADN < 213> secuencia artificial	
	<220> < 223> Oligonucleótido	
35	<400> 14 attgggctta ccttgacagca cgacgacgcc attgccgctt atgaagcaaa acaacctgcg	60
	tttatgaatt aatcccccttg cccgggtcaaa tgaccgggct ttccgctatc gtccacgtca	120
	tgtaggctgg agctgcttcg	140
	<210> 15 < 211> 20 < 212> ADN < 213> secuencia artificial	
40	<220> < 223> Oligonucleótido	
	<400> 15 gatgggatgg ctggcaaagt	20
45	<210> 16 < 211> 24	

	< 212> ADN	
	< 213> secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
5	<400> 16	
	cgagtttgc tgacatcttc tacg	24
	<210> 17	
	< 211> 753	
10	< 212> ADN	
	< 213> secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> TT07 region	
	<400> 17	
	taaggagggtt ataaatggaa tctgatgaaa gcggtctgcc tgcaatggaa attgaatgtc	60
	gtattaccgg caccctgaat ggtgttgaat ttgaactggg tgggtgggtg gaaggtacac	120
	cgggaacaggg tcgtatgacc aataaaatga aaagcaccaa aggtgcactg acctttagcc	180
	cgtatctgct gtctcatgtt atgggctatg gcttttatca ttttggcacc tatccgagcg	240
	gttatgaaaa tccgtttctg catgccatta ataatggtgg ctataccaat acccgcatcg	300
	aaaaatatga agatgggtgg gttctgcatg ttagcttttag ctatcgttat gaagccggtc	360
	gtgtgattgg tgattttaaa gttatgggca ccggttttcc ggaagatagc gtgattttta	420
	ccgataaaat tattcgcagc aatgccaccg ttgaacatct gcacccgatg ggtgataatg	480
15	atctggatgg tagctttacc cgtaccttta gcctgcgtga tgggtggttat tatagcagcg	540
	ttgtggatag ccatatgcat tttaaaagcg ccattcatcc gagcattctg cagaacgggtg	600
	gtccgatgtt tgcatttcgt cgtgtggaag aagatcatag caataccgaa ctgggcattg	660
	ttgaatatca gcatgccttt aaaacaccgg atgcagatgc cgggtgaagaa taagtatact	720
	cacactggct caccttcggg tgggcctttc tgc	753
	<210> 18	
	< 211> 1434	
	< 212> ADN	
20	< 213> Escherichia coli	

ES 2 654 589 T3

<400> 18
atgtttaaga atgcatttgc taacctgcaa aaggtcggta aatcgctgat gctgccggta 60
tccgtactgc ctatcgacag tattctgctg ggcgtcggtt ccgcgaattt cagctggctg 120
cccgccgttg tatcgcatgt tatggcagaa gcaggcggtt ccgtctttgc aaacatgcca 180
ctgatttttg cgatcggtgt cgccctcggc tttaccaata acgatggcgt atccgcgctg 240
gccgcagttg ttgcctatgg catcatgggt aaaaccatgg ccgtgggtgc gccactggta 300
ctgcatttac ctgctgaaga aatcgctctt aaacacctgg cggatactgg cgtactcgga 360
gggattatct ccggtgcgat cgcagcgtac atgtttaacc gtttctaccg tattaagctg 420
cctgagtatc ttggcttctt tgccggtaaa cgctttgtgc cgatcatttc tggcctggct 480
gccatcttta ctggcggtgt gctgtccttc atttggccgc cgattgggtc tgcaatccag 540
accttctctc agtgggctgc ttaccagaac ccggtagttg cgtttggcat ttacggtttc 600
atcgaacgtt gcctgggtacc gtttgggtct caccacatct ggaacgtacc tttccagatg 660
cagattgggtg aatacaccaa cgcagcaggt caggttttcc acggcgacat tccgcgttat 720
atggcgggtg acccgactgc gggtaaaactg tctggtggct tcctgttcaa aatgtacggt 780
ctgccagctg ccgcaattgc tatctggcac tctgctaaac cagaaaaccg cgcgaaagtg 840
ggcgggtatta tgatctccgc ggcgctgacc tcgttcctga ccggtatcac cgagccgac 900
gagttctcct tcatgttcgt tgcgccgac ctgtacatca tccacgcgat tctggcaggc 960
ctggcattcc caatctgtat tcttctgggg atgcgtgacg gtacgtcgtt ctgcacggt 1020
ctgatcgact tcacgttctt gtctggtaac agcagcaaac tgtggctggt cccgatcgtc 1080
ggtatcggtt atgcgattgt ttactacacc atcttccgcg tgctgattaa agcactggat 1140
ctgaaaaacgc cgggtcgtga agacgcgact gaagatgcaa aagcgacagg taccagcgaa 1200
atggcaccgg ctctgggtgc tgcatttggt ggtaaagaaa acattactaa cctcgacgca 1260
tgtattaccc gtctgcgcgt cagcgttgct gatgtgtcta aagtggatca ggccggcctg 1320
aagaaactgg gcgcagcggg cgtagtggtt gctggttctg gtgttcaggc gattttcgggt 1380
actaaatccg ataacctgaa aaccgagatg gatgagtaca tccgtaacca ctaa 1434

<210> 19
<211> 32
<212> RNA
<213> Escherichia coli

<400> 19
gcacccauac ucaggagcac ucucauuau gu 32

<210> 20
<211> 227
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 20
gatgaagcaa gggggtgcc catgcgtcag ttttatcagc actattttac cgcgacagcg 60
aagttgtgct ggttgcggtg gtttaagcgtc ccacaacgat taaccatgct tgaaggactg 120
atgcagtggg atgaccgcaa ttctgaaagt tgacttgccct gcatcatgtg tgactgagta 180
ttggtgtaaa atcaccgcgc agcagattat acctgctggt tttttttt 227

ES 2 654 589 T3

	<210> 21	
	< 211> 132	
	< 212> ADN	
	< 213> Escherichia coli	
5	<400> 21	
	atgctgcagt tttatcagca ctatcttacc ggcacagcga agttgtgctg gttgcgttgg	60
	ttaagcgtcc cacaacgatt aaccatgctt gaaggactga tgcagtggga tgaccgcaat	120
	tctgaaagtt ga	132
	<210> 22	
	< 211> 1221	
	< 212> ADN	
10	< 213> Escherichia coli	
	<400> 22	
	gtgggtgctg aaaaccagcc tgggcacatt gatcaaataa agcagaccaa cgcgggcgcg	60
	gtttatcgcc tgattgatca gcttgggtcca gtctcgcgta tcgatctttc cgtctcggcg	120
	caactggctc ctgccagtat cactaaaatt gtccgtgaga tgctogaagc acacctgggtg	180
	caagagctgg aaatcaaaga agcggggaac cgtggccgctc cggcgggtggg gctgggtggtt	240
	gaaactgaag cctggcacta tctttctctg cgcattagtc gcggggagat tttccttgct	300
	ctgcgcgctc tgagcagcaa actgggtggtg gaagagtcgc aggaactggc gttaaaagat	360
	gacttgccat tgctggatcg tattatttcc catatcgatc agttttttat cgcgccaccag	420
	aaaaaacttg agcgtctaac ttcgattgcc ataaccttgc cgggaattat tgatacggaa	480
	aatggtattg tacatcgcat gccgttctac gaggatgtaa aagagatgcc gctcggcgag	540
	gcgctggagc agcataccgg cgttccggtt tatattcagc atgatatcag cgcattggacg	600
	atggcagagg ccttggttgg tgccctcacgc ggggcgcgcg atgtgattca ggtggttato	660
	gatcacaacg tgggggcggg cgtcattacc gatggctatc tgctacacgc aggcagcagt	720
	agtctcgtgg aaataggcca cacacagtc gaccctgatg ggaaacgctg ttattgcggg	780
	aatcacggct gcctcgaaac catcgccagc gtggacagta ttcttgagct ggcacagctg	840
	cgtcttaatc aatccatgag ctcgatgtta catggacaac cgttaaccgt ggactcattg	900
	tgtcaggcgg cattgcgcgg cgatctactg gcaaaaagaca tcattaccgg ggtgggcgcg	960
	catgtcgggc gcattcttgc catcatggtg aatttattta accacaaaa aatactgatt	1020
	ggctcacgct taagtaaagc ggcagatc ctcttcccg tcctctcaga cagcatccgt	1080
	cagcaggccc ttcctgcgta tagtcagcac atcagcgttg agagtactca gttttctaac	1140
	cagggcacga tggcaggcgc tgcaactggtg aaagacgcga tgtataacgg ttctttgttg	1200
	attcgtctgt tgcagggtta a	1221
15	<210> 23	
	< 211> 41	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 23	
	cgtaggcgcc ggtaccgacc tcaatatcga ccagctacg c	41

	<210> 24		
	< 211> 95		
	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 24		
	gcttgtatac aacagataaa acgaaaggcc cagtctttcg actgagcctt tegtatttatt	60	
	tgatgcattg aaatgctcat agggatatcgg gtcgc	95	
10	<210> 25		
	< 211> 90		
	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		
	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
15	<400> 25		
	agactgggcc ttctgtttta tctgttgtat acaagcttaa ttaacctagg gcccgggcgg	60	
	atccgtgagt gatgtgaaag cctgacgtgg	90	
	<210> 26		
	< 211> 42		
	< 212> ADN		
20	< 213> Secuencia artificial		
	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 26		
	cgtaggcgcc ggtaccgaa ctgcactaag taacctctc gg	42	
25	<210> 27		
	< 211> 35		
	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 27		
	tccccgggg tataccatat gaatacctc ctag	35	
	<210> 28		
	< 211> 30		
35	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		
	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		
	<400> 28		
40	gcccaagctt ttaggctgg agctgctcg	30	
	<210> 29		
	< 211> 140		
	< 212> ADN		
	< 213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	< 223> Oligonucleótido		

ES 2 654 589 T3

	<400> 29		
	cgtagttaac ttaattaaga gctgttgaca attaatcatc cggctcgtat aatgtgtgga	60	
	aggtggagtt atctcgagtg agatattgtt gacgtaagga ggttataaat gcccatatcc	120	
	aagataactcg ttgccaatcg	140	
5	<210> 30 < 211> 82 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 30		
	cgacccgggc ctagggcaga aaggcccacc cgaaggtgag ccagtgtgag cggccgctca	60	
10	tccgccgtaa accgccagca gg	82	
	<210> 31 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
15	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 31		
	gccgatttg tcgtggtggc	20	
20	<210> 32 < 211> 22 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220> < 223> Oligonucleótido		
25	<400> 32		
	gccggttatc catcagggtc ac	22	
	<210> 33 < 211> 39 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
30	<220> < 223> Oligonucleótido		
	<400> 33		
	ctgaggccta tgcatggaat gcaatcgtag ccacatcgc	39	
35	<210> 34 < 211> 94 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial		
	<220> < 223> Oligonucleótido		
40	<400> 34		
	gcttgtatac aacagataaa acgaaaggcc cagtctttcg actgagcctt togttttatt	60	
	tgatggctgg aaaaaccttg ttgagagtgt ttgc	94	
	<210> 35 < 211> 98		

	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
5	<400> 35	
	agactgggcc ttctgtttta tctgttgtat acaagcttaa ttaacctggg ccctcgcccg	60
	ggcggatccg gtaatcgaac gattattctt taatcgcc	98
	<210> 36	
	< 211> 39	
10	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 36	
	ctgaggccta tgcacgcga ttcgttgga agttcaggg	39
15	<210> 37	
	< 211> 128	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 37	
	ctctagaact agtttatctc tggcgggtgtt gacataaata ccactggcgg ttatactgag	60
	cacagtcgac gttaacacgc gttaaggagg ttataaatgc ccatatccaa gatactcggt	120
	gccaatcg	128
	<210> 38	
	< 211> 81	
25	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 38	
	tcgagcccg ggcagaaagg cccacccgaa ggtgagccag tacgtaagta ctttaattaa	60
30	tcacccgccc taaaccgcca g	81
	<210> 39	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 39	
	gccaccagc gaaccaattg	20
40	<210> 40	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	

5	<400> 40	
	gtaaacgtgg tgccatcggg	20
	<210> 41	
	< 211> 20	
10	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
15	<400> 41	
	cctggcaaat aacccgaatg	20
	<210> 42	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> Oligonucleótido	
	<400> 42	
	cccattcaga gagtggacgc	20

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo recombinante para la producción de metionina mejorada que comprende:
 - a) modificaciones para producir metionina a partir de glucosa como fuente principal de carbono por fermentación,
 - b) modificaciones para mejorar la importación de glucosa por sobreexpresión del gen *ptsG* que codifica la enzima del PTS IICB^{Glc} y eliminación del gen *dgsA*, y
 - c) en donde se atenúa la expresión de al menos uno de los siguientes genes: *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU*, *yncA* o *udhA*.
2. El microorganismo de la reivindicación 1, en donde el gen *ptsG* es sobreexpresado bajo el control de un promotor inducible o constitutivo.
3. El microorganismo de la reivindicación 2, en donde el gen *ptsG* no contiene la secuencia del sitio de unión para el ARN pequeño *sgrS*.
4. El microorganismo de las reivindicaciones 1 o 3, en donde se atenúa la expresión del gen *sgrS* y/o *sgrT*.
5. El microorganismo de la reivindicación 4, en donde se elimina el gen *sgrS* y/o *sgrT*.
6. El microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se potencia la expresión de al menos uno de los siguientes genes: *pyc*, *pntAB*, *cysP*, *cysU*, *cysW*, *cysA*, *cysM*, *cysJ*, *cysI*, *cysH*, *gcvT*, *gcvH*, *gcvP*, *lpd*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *metF*, *metH*, *thrA*, un alelo de *metA* que codifica una enzima con menor sensibilidad por retroalimentación a la S-adenosilmetionina y/o metionina (*MetA**), o un alelo de *thrA* que codifica una enzima con menor inhibición por retroalimentación de treonina (*thrA**).
7. El microorganismo de la reivindicación 6, en donde al menos uno de dichos genes potenciados está bajo el control de un promotor inducible.
8. El microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde:
 - a) el gen *pstG* no contiene el sitio de unión del ARNp *sgrS* y/o se elimina el gen *sgrS* y/o se elimina el gen *sgrT*;
 - b) se potencia la expresión de los genes *metA**, *metH*, *cysPUWAM*, *cysJIH*, *gcvTHP*, *metF*, *serA*, *serB*, *serC*, *cysE*, *thrA** y *pyc*; y
 - c) se atenúa la expresión de los genes *metJ*, *pykA*, *pykF*, *purU* y *yncA*.
9. El microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho microorganismo es de la familia de bacterias *Enterobacteriaceae* o *Corynebacteriaceae*.
10. El microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho microorganismo es *Escherichia coli*.
11. Un método para la producción fermentativa de metionina o derivados de metionina, que comprende las etapas de:
 - a) cultivar el microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en un medio de cultivo adecuado que comprende una fuente de carbono fermentable que contiene glucosa y una fuente de azufre, y
 - b) recuperar la metionina o derivados de metionina del medio de cultivo.

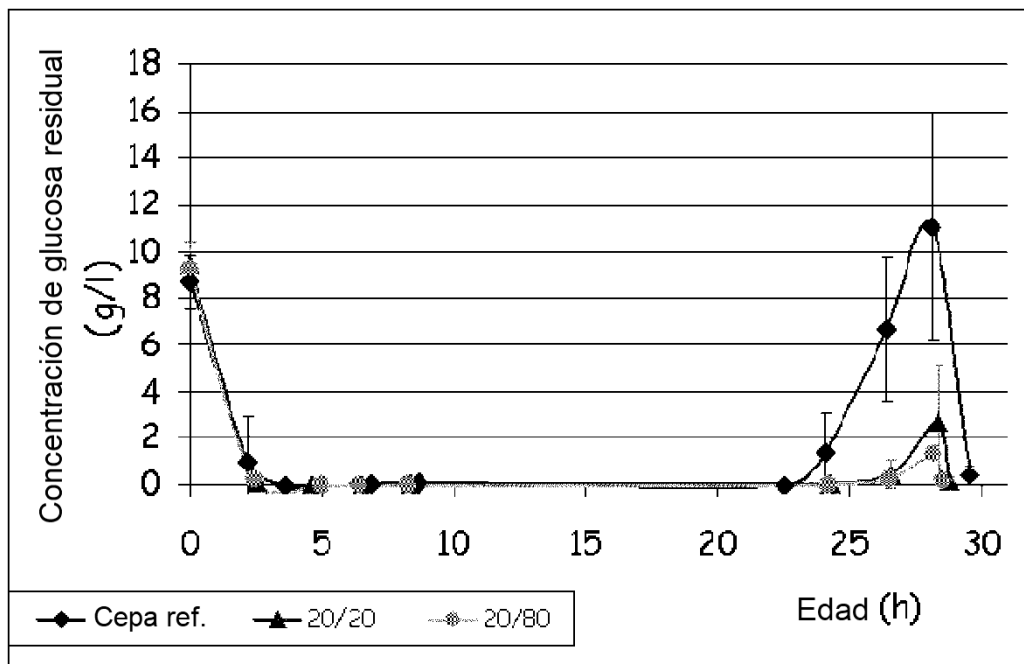


FIG 1