

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 911**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/08** (2006.01)

**C12R 1/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009** E 09157324 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** EP 2128264

54 Título: **Microorganismo que produce precursor de L-metionina y el procedimiento de producir precursor de L-metionina utilizando el microorganismo**

30 Prioridad:

**04.04.2008 US 62927**

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

**06.02.2017**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
500, NAMDAEMUNRO 5-GA JUNG-GU  
SEOUL 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**SHIN, YOUNG UK;  
KIM, SO YOUNG;  
CHANG, JIN SOOK;  
CHO, YOUNG WOOK;  
LEE, HAN JIN;  
HEO, IN KYUNG;  
NA, KWANG HO;  
SEO, CHANG IL;  
KIM, CHUL HA y  
UM, HYE WON**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 599 911 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Microorganismo que produce precursor de L-metionina y el procedimiento de producir precursor de L-metionina utilizando el microorganismo

**Antecedentes**

5 La metionina es uno de los aminoácidos esenciales del cuerpo humano que se ha utilizado ampliamente como aditivo de piensos y alimentos y se utiliza adicionalmente como materia prima sintética para soluciones médicas y suministros médicos. La metionina actúa como un precursor de compuestos tales como la colina (lecitina) y la creatina y al mismo tiempo se utiliza como una materia prima de síntesis para cisteína y taurina. La metionina también puede proporcionar azufre. La S-adenosil-metionina se deriva de L-metionina y tiene un cierto papel en  
10 suministrar grupos metilos en el cuerpo humano y también está implicada en la síntesis de diversos neurotransmisores en el cerebro. La metionina y/o la S-adenosil-L-metionina (SAM) inhibe la acumulación de grasa en el hígado y las arterias y alivia la depresión, la inflamación, la enfermedad hepática y el dolor muscular, etc.

Las funciones *in vivo* de metionina y/o S-adenosil-L-metionina conocidas hasta ahora son las siguientes.

15 1) Inhibe la acumulación de grasa en el hígado y las arterias promoviendo el metabolismo de los lípidos y mejora la circulación sanguínea en el cerebro, el corazón y el riñón (J Hepatol. Jeon BR y col., 2001 marzo; 34 (3): 395-401).

2) Promueve la digestión, la detoxificación y la excreción de sustancias tóxicas y la excreción de metales pesados tales como Pb.

3) Se puede administrar como un agente antidepresión a la dosificación de 800 - 1600 mg/día (Am J Clin Nutr. Mischoulon D. y col., noviembre de 2002; 76 (5): 1158S-61S).

20 4) Potencia las funciones del hígado (FASEB J. Mato JM., enero de 2002; 16 (1): 15-26) y en particular es eficaz en la enfermedad del hígado causada por el alcohol (Cochrane Database Syst Rev., Rambaldi A., 2001; (4): CD002235).

25 5) Tiene un efecto antiinflamatorio sobre enfermedades de los huesos y de las articulaciones y promueve la recuperación de las articulaciones (ACP J Club. Sander O., enero-febrero de 2003; 138 (1): 21, J Fam Pract, Soeken KL y col., mayo de 2002.; 51 (5): 425-30).

6) Es un nutriente esencial para el cabello. Proporciona la nutrición al cabello y por lo tanto evita la pérdida de pelo (Audiol Neurootol, Lockwood DS y col., septiembre-octubre de 2000; 5 (5): 263-266).

La metionina puede sintetizarse química o biológicamente para aplicarse a piensos, alimentos y medicamentos.

30 En la síntesis química, la metionina se produce mayoritariamente por hidrólisis de 5-(β-metilmercaptoetil)-hidantoína. La metionina sintetizada químicamente tiene la desventaja de que solo se produce como una forma mixta de tipo L y tipo D.

En la síntesis biológica, la metionina se produce por el procedimiento que utilizan las proteínas implicadas en la síntesis de metionina. La L-metionina se biosintetiza a partir de homoserina por la acción de la enzima expresada por genes tales como el metA, metB, metC, metE y metH en *Escherichia coli*. En particular, metA es el gen que  
35 codifica la homoserina O-succiniltransferasa que es la primera enzima necesaria para la biosíntesis de metionina y convierte homoserina en O-succinil-L-homoserina. La O-succinilhomoserina liasa o la cistationina gamma sintasa codificada por el gen metB convierte O-succinilhomoserina en L-cistationina. La cistationina beta liasa codificada por el gen metC convierte cistationina en L-homocisteína. El metE codifica metionina sintasa independiente de cobalamina y el metH codifica metionina sintasa dependiente de cobalamina, que convierten L-homocisteína en L-metionina ambas. En este momento, 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa codificada por metF y serina hidroximetiltransferasa codificada por glyA trabajan conjuntamente para sintetizar N(5)-metiltetrahidrofolato que  
40 proporciona grupos metilos necesarios para la síntesis de L-metionina.

L-metionina se sintetiza mediante una serie de reacciones orgánicas por las enzimas anteriores. La modificación genética de las proteínas anteriores u otras proteínas que afectan a las proteínas anteriores podrían resultar en el  
45 aumento de la síntesis de L-metionina. Por ejemplo, la publicación de patente japonesa abierta a inspección pública N.º: 2000/139471 describe un procedimiento de producción de L-metionina con la *Escherichia sp.* de la que se eliminan los genes thrBC y metJ en el genoma, metBL se sobreexpresa y metK se sustituye por un mutante rezumante. Además, la publicación de patente de los EE.UU. N.º: US2003/0092026 A1 describe un procedimiento que utiliza un microorganismo con metD (inhibidor de la síntesis de L-metionina) desactivado que pertenece a  
50 *Corynebacterium sp.* La solicitud de patente de los EE.UU. N.º: US2002/0049305 describe un procedimiento para aumentar la producción de L-metionina aumentando la expresión de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (metF).

La metionina producida por el procedimiento biológico es de tipo L, que tiene ventajas, pero la cantidad de producción es demasiado pequeña. Esto es porque la ruta biosintética de metionina tiene sistemas de regulación de retroalimentación muy ajustados. Una vez que la metionina se sintetiza a un cierto nivel, el producto final metionina

inhibe la transcripción del gen *metA* que codifica la proteína principal para la iniciación de la biosíntesis de metionina. La sobreexpresión del gen *metA* en sí misma no puede aumentar la producción de metionina debido a que el gen *metA* se suprime por la metionina en la etapa de la transcripción y luego se degrada por las proteasas intracelulares en la fase de traducción (Dvora Biran, Eyal Gur, Leora Gollan y Eliora Z. Ron: Control of methionine biosynthesis in *Escherichia coli* by proteolysis: *Molecular Microbiology* (2000) 37(6), 1436-1443). Por lo tanto, muchas de las patentes anteriores se han centrado en cómo liberar el gen *metA* de su sistema de regulación de retroalimentación (documentos WO2005/108561, WO1403813).

La publicación de patente de los EE.UU. N.º: US2005/0054060A1 describe un procedimiento para sintetizar homocisteína o metionina por cistationina sintasa modificada (O-succinilhomoserina liasa) que utiliza metilmercaptano ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) o sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) directamente como una fuente de azufre, no cisteína. Sin embargo, se entiende bien por aquellos en la técnica que la cistationina sintasa puede unir diversos precursores de metionina en las células y por lo tanto producir subproducto a alto nivel. Por ejemplo, se informó de que la cistationina sintasa acumula altos niveles de homolantionina por reacción secundaria de O-succinilhomoserina y homocisteína (*J. Bacteriol* (2006) vol. 188: p. 609-618). Por lo tanto, la sobreexpresión de cistationina sintasa puede reducir la eficacia de la reacción intracelular debido al aumento de su reacción secundaria. Además, este procedimiento tiene muchas desventajas. Este procedimiento utiliza las rutas metabólicas intracelulares que tienen reacciones secundarias y los sistemas de regulación de retroalimentación. Además este proceso utiliza  $\text{H}_2\text{S}$  o  $\text{CH}_3\text{SH}$  que tienen una citotoxicidad grave para las células. Por lo tanto el rendimiento de producción de metionina es comparativamente pequeño.

Para resolver estos problemas, el autor de la presente invención ha desarrollado un proceso de dos etapas que comprende; primera etapa de producción de precursor de L-metionina por fermentación de *E. coli*; y segunda etapa de conversión de precursor de L-metionina en L-metionina por reacción enzimática (documento PCT/KR2007/003650). Este procedimiento de dos etapas puede resolver los problemas anteriores, tales como la citotoxicidad de sulfuros, la regulación de retroalimentación por metionina y SAME, la descomposición del producto intermedio por enzimas intracelulares (por ejemplo cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa y O-acetilhomoserina sulfhidrilasa). Además, frente al procedimiento de síntesis de metionina químico que produce una forma mixta de D-metionina y L-metionina, el procedimiento de dos etapas es muy eficaz para producir solamente L-metionina selectivamente.

En este procedimiento de dos etapas, el rendimiento de producción de precursor de metionina es uno de los factores clave para el aumento del rendimiento de producción de metionina. Para aumentar el rendimiento de síntesis del precursor de metionina, O-succinilhomoserina, es realmente importante una buena combinación de aspartocinasa fuerte, homoserina transferasa y O-succinilhomoserina transferasa resistente a la retroalimentación. En los antecedentes antes mencionados, los autores de la presente invención estaban produciendo un microorganismo que puede producir O-succinilhomoserina caracterizado por los siguientes puntos: 1) la actividad de homoserina O-succiniltransferasa se introduce y potencia, en lo que la actividad de homoserina O-succiniltransferasa es resistente a retroalimentación por metionina; y 2) la actividad de aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa (EC2.7.2.4 o 1.1.1.3) se potencia. Esta cepa es capaz de producir altas concentraciones de precursor de L-metionina, independientemente de la concentración de metionina en el medio de cultivo y la producción de L-metionina se puede aumentar notablemente.

[Sumario]

La presente invención proporciona un microorganismo derivado de *Escherichia sp.* para la producción de O-succinilhomoserina, en la que dicho microorganismo:

(i) comprende una homoserina O-succiniltransferasa resistente a inhibición por retroalimentación de metionina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 14, 16, 18, 20 o 22.

(ii) tiene una aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa que tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID No: 29; y

(iii) tiene una actividad de cistationina gamma sintasa que esta inactivada.

También se proporciona un procedimiento para producir O-succinilhomoserina, comprendiendo el procedimiento:

a) fermentación de los microorganismos de acuerdo con la invención:

b) enriquecimiento de la O-succinilhomoserina en el medio o en los microorganismos; y

c) aislamiento de la O-succinilhomoserina.

[Breve descripción de los dibujos]

La aplicación de las formas de realización preferidas de la presente invención se entiende mejor con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Fig. 1 es un diagrama que ilustra la manipulación genética de la cepa que produce un precursor de metionina.

Fig. 2 es un diagrama que ilustra las estructuras químicas del proceso de 2 etapas para la producción de metionina.

Fig. 3 es un diagrama esquemático de pMetA-CL para la expresión del gen metA resistente a retroalimentación.

[Descripción detallada]

5 Se da a conocer un microorganismo que puede producir precursor de L-metionina por los siguientes puntos: 1) la actividad de homoserina O-succiniltransferasa se introduce y mejora, en el que la actividad de O-homoserina succiniltransferasa es resistente a retroalimentación por metionina; y 2) la aspartocinasa o actividad homoserina deshidrogenasa (EC2.7.2.4 o 1.1.1.3) se mejora.

10 La expresión "precursor de L-metionina" se define como metabolitos que son parte de la ruta metabólica específica de metionina o se pueden derivar de estos metabolitos. Particularmente, el precursor de L-metionina como se utiliza en el presente documento se refiere a una O-succinilhomoserina.

15 La expresión "cepa precursor productora de L-metionina", como se utiliza en el presente documento se refiere a una cepa de microorganismo procarionta o eucariota que es capaz de acumular el precursor de L-metionina por la manipulación de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, la cepa se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en los microorganismos *Escherichia sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Providencia sp.*, *Corynebacteria sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Leptospira sp.*, *Salmonella sp.*, *Brevibacteria sp.*, *Hypomononas sp.*, *Chromobacterium sp.* y *Nocardia sp.* u hongos o levaduras. Preferentemente, los microorganismos de *Escherichia sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Leptospira sp.* y levaduras se pueden utilizar para producir O-succinilhomoserina. Más preferentemente, se pueden utilizar los microorganismos de *Escherichia sp.* y lo más preferentemente se puede utilizar *Escherichia coli* (de aquí en adelante referida como "*E. coli*").

20 Se da a conocer una cepa de producción de precursor de L-metionina en la que se elimina o se debilita un gen implicado en la descomposición de la auténtica O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina y en su lugar un gen implicado en la síntesis de O-succinilhomoserina que es resistente a la retroalimentación se introduce o se potencia. También se da a conocer una cepa en la que la ruta de la biosíntesis de treonina se bloquea o se debilita para potenciar la producción de O-succinilhomoserina. También se da a conocer una cepa en la que la aspartocinasa o la homoserina deshidrogenasa está sobreexpresada o potenciada en su actividad. También se da a conocer una cepa en la que se introduce un sistema de homoserina O-succiniltransferasa libre de regulación por retroalimentación, se sobreexpresa y se potencia su actividad y la aspartocinasa o la homoserina deshidrogenasa está sobreexpresada o potenciada en su actividad.

30 Se da a conocer una cepa que produce el precursor de L-metionina proporcionada eliminando gen metB implicado en la descomposición del precursor de L-metionina, gen thrB implicado en la ruta de biosíntesis de treonina y gen metJ que regula la transcripción de genes de producción de precursores de L-metionina. Se da a conocer una cepa que produce el precursor de L-metionina proporcionada anulando el gen metA auténtico o el gen metX implicados en la síntesis del precursor de metionina e introduciendo un metA resistente a la retroalimentación. También se da a conocer una cepa que produce el precursor de L-metionina proporcionada potenciando la actividad codificada por el gen thrA.

35 Se da a conocer una cepa que produce precursor de L-metionina proporcionada anulando el gen metA auténtico o el gen metX, introduciendo un gen de metA resistente a retroalimentación y potenciando el gen thrA. Los genes metA que son resistentes a retroalimentación se introducen y confirman en la patente anterior (documento PCT/KR2007/003650).

40 En la presente invención, "inactivación" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una delección o una atenuación del gen. Una delección del gen se lleva a cabo cortando una región del gen o modificando la secuencia de la proteína introduciendo una secuencia génica específica en el cromosoma. El término "atenuación" o "debilitamiento" a este respecto describe la reducción o la eliminación de la actividad intracelular de una o más enzimas (proteínas) en un microorganismo que están codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo reduciendo la actividad de la proteína modificando una región promotora del gen y la secuencia de nucleótidos de 5'-UTR o introduciendo la mutación en la región ORF del gen diana. Por medidas de atenuación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se reduce en general a del 0 al 75 %, del 0 al 50 %, del 0 al 25 %, del 0 al 10 % o a del 0 al 5 % de la actividad o concentración de la proteína de tipo silvestre o de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

50 Para lograr una atenuación, por ejemplo, la expresión del gen o las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas pueden reducirse o eliminarse. Las dos medidas pueden combinarse opcionalmente.

55 La reducción en la expresión génica puede tener lugar por cultivo adecuado, por modificación genética (mutación) de las estructuras de señal de la expresión génica o también por la técnica de ARN antisentido. Las estructuras de señal de la expresión génica son, por ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de unión a ribosomas, el codón de iniciación y los terminadores. El experto puede encontrar información a este respecto, entre otras cosas, por ejemplo, en Jensen y Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58: 191 195 (1998)), en Carrier y Keasling (*Biotechnology Progress* 15: 58 64 (1999)), Franch y

Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3: 159 164 (2000)) y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers ("Molecular Genetics", 6ª edición, 1995) o aquel de Winnacker ("Genes and Clones", 1990).

- 5 Las mutaciones que conducen a un cambio o reducción en las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas se conocen a partir de la técnica anterior. Los ejemplos que se pueden mencionar son los trabajos de Qiu y Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611 8617 (1997)), Yelton y col. (Proceedings of the National Academy of Sciences, EE.UU., 95: 5511 5515 (1998)) y Wentz y Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266: 20833; 20839 (1991)). Descripciones en resumen se pueden encontrar en libros de texto de genética y de biología molecular conocidos, tales como por ejemplo aquel de Hagemann ("General Genetics", 1986).
- 10 Las posibles mutaciones son transiciones, transversiones, inserciones y deleciones. Dependiendo del efecto del intercambio de aminoácidos sobre la actividad enzimática, se hace referencia a "mutaciones de sentido erróneo" o a mutaciones sin sentido. Las inserciones o deleciones de al menos un par de bases en un gen conducen a "mutaciones de desplazamiento de marco", que conducen a aminoácidos incorrectos que se incorporan o a traducción que se interrumpe prematuramente. Si un codón de parada se forma en la región codificante como una consecuencia de la mutación, esto conduce también a una terminación prematura de la traducción. Las deleciones de varios codones conducen típicamente a una pérdida completa de la actividad enzimática. Las instrucciones sobre la generación de tales mutaciones son técnica anterior y se pueden encontrar en libros de texto conocidos de genética y de biología molecular, tales como por ejemplo el libro de texto de Knippers ("Molecular Genetics", sexta edición, 1995), aquel de Winnacker ("Genes and Clones", 1990) o aquel de Hagemann ("General Genetics", 1986).
- 15
- 20 Mutaciones adecuadas en los genes, tales como, por ejemplo, mutaciones de deleción, se pueden incorporar en cepas adecuadas por sustitución de genes o alelos.

El término "mejora" describe el aumento en la actividad intracelular de una enzima que está codificada por el ADN correspondiente. El aumento de la actividad intracelular de una enzima se puede lograr mediante la sobreexpresión del gen. La sobreexpresión del gen diana puede lograrse modificando la región promotora del gen o la secuencia de nucleótidos de la región 5'-UTR. La sobreexpresión del gen diana también puede lograrse introduciendo la copia extra del gen diana en el cromosoma, transformando la cepa huésped con el vector que contiene el gen diana con un promotor, o introduciendo la mutación que puede aumentar la expresión en el gen diana. El aumento de la actividad intracelular de una enzima también se puede lograr mediante la introducción de la mutación en la región ORF del gen diana. Por medidas de mejora, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se aumenta en general en al menos el 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, hasta un máximo del 1000 % o el 2000 %, en base a la proteína de tipo silvestre o a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

25

30

Un procedimiento dado a conocer para preparar una cepa que produce un precursor de L-metionina es el siguiente.

35 En la etapa 1, un gen que codifica proteínas tales como cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa se elimina o se debilita en una cepa con el fin de acumular un precursor de L-metionina tal como O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina.

El gen que codifica la cistationina gamma sintasa está indicado como metB, el gen que codifica la O-succinilhomoserina sulfhidrilasa está indicado como metZ y el gen que codifica O-acetilhomoserina sulfhidrilasa está indicado como metY. Un gen que codifica la proteína que tiene la actividad mencionada anteriormente se ejemplifica por metB en Escherichia coli. La secuencia genómica del gen se puede obtener a partir de la secuencia genómica de E. coli (número de acceso: AAC75876) comunicada en el artículo anterior (Blattner y col., Science 277: 1453-1462 (1997)). La secuencia genómica anterior también se puede obtener del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) y del DDBJ (Banco de Datos de ADN de Japón). Otros genes que tienen la misma actividad se ejemplifican por metB y metY derivados de Corynebacterium y metZ derivado de Pseudomonas.

40

45 Cistationina gamma sintasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa tiene la actividad para convertir O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina en cistationina u homocisteína como se muestra en las siguientes fórmulas de reacción. Por lo tanto, donde un gen que tiene esta actividad se elimina o debilita, O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina se acumula excesivamente en la solución de cultivo.

L-cisteína + O-succinil-L-homoserina  $\rightleftharpoons$  succinato + cistationina

50 L-cisteína + O-acetil-L-homoserina  $\rightleftharpoons$  etilo + cistationina

HS<sup>-</sup> + O-succinil-L-homoserina  $\rightleftharpoons$  succinato + homocisteína

HS<sup>-</sup> + O-acetil-L-homoserina  $\rightleftharpoons$  acetato + homocisteína

En la etapa 2, el gen thrB de codificación de homoserina cinasa en la cepa preparada en la etapa 1 se elimina o se debilita. El gen thrB está implicado en la síntesis de O-fosfohomoserina a partir de homoserina, que luego se convierte en treonina por el gen thrC. El gen thrB se elimina o se debilita con el fin de utilizar toda la homoserina

55

intracelular para la síntesis del precursor de la metionina.

En la etapa 3, un regulador de la transcripción de la ruta sintética de metionina se elimina o se debilita. Los genes metA, metB, metC, metE y metF implicados en la síntesis de metionina se reprimen por el sistema de regulación de retroalimentación. El gen metJ es un gen regulador de transcriptor típico en *E. coli*. Para permitir que el gen metA o el gen metX se sobreexpresa para sintetizar el precursor de metionina, metJ debe eliminarse. Por lo tanto, si el gen metJ se elimina en *E. coli*, la expresión de genes metA o metX siempre se aumenta, lo que lleva a la producción en masa de precursor de L-metionina.

Las etapas anteriores 2 y 3 pueden modificarse o eliminarse de acuerdo con una cepa productora de precursor. Sin embargo, ello se puede ejecutar más preferentemente para mejorar la ruta de producción del precursor en el microorganismo de *Escherichia sp.*

En la etapa 4, se introduce homoserina O-succiniltransferasa resistente a retroalimentación, que media el primer proceso de ruta de biosíntesis de metionina. MetA es una designación común del gen que codifica la proteína que tiene actividad de homoserina O-succiniltransferasa. La actividad de homoserina O-succinilo resistente a la retroalimentación es el resultado del gen metA resistente a retroalimentación mutante. El documento PCT/US2007/009146 da a conocer el procedimiento para preparar gen de metA resistente a la retroalimentación. En la presente invención, la secuencia de aminoácidos codificada por gen metA 10 resistente a retroalimentación está representada en la SEQ. ID. NO: 14, por el gen de metA 11 está representada en la SEQ. ID. NO: 16, por el gen de metA 32 gen está representada en la SEQ. ID. NO: 18, por el gen de metA 37 gen está representada en la SEQ. ID. NO: 20, por el gen de metA 41 gen está representada en la SEQ. ID. NO: 22 (documento PCT/US2007/009146). Se da a conocer un péptido homoserina O-succiniltransferasa con número de acceso de GenBank: AP 004514 que tiene mutaciones en las posiciones de aminoácidos 24, 29, 79, 114, 140, 163, 222, 275, 290, 291, 295, 297, 304, 305, o combinaciones de las mismas.

La introducción o la mejora del gen metA se lleva a cabo introduciendo el gen o modificando una región promotora del gen y la secuencia de nucleótidos de 5'-UTR o introduciendo la mutación en la región ORF del gen diana. La introducción de un gen metA mutante que está libre de los resultados del sistema de regulación de retroalimentación da como resultado el aumento de la síntesis de precursores de L-metionina independientemente de la concentración de metionina en el medio de cultivo.

Además, la producción de O-succinilhomerina se puede incrementar más eliminando el gen metA auténtico en el cromosoma y luego introduciendo un gen metA mutante al mismo. El gen metA resistente a retroalimentación sometido al promotor metA que potencia eliminando gen metJ puede producir más O-succinilhomerina.

En la etapa 5, aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa está potenciada en su actividad para aumentar la síntesis de homoserina, precursora de la O-succinilhomerina. El thrA es una designación común del gen que codifica el péptido que tiene la actividad de la aspartocinasa y la homoserina deshidrogenasa. La mejora de la actividad de thrA se lleva a cabo introduciendo la mutación en el gen thrA o por la integración múltiple del gen thrA en el cromosoma o introduciendo del plásmido que contiene el gen thrA.

Se da a conocer que preferentemente una aspartocinasa y homoserina deshidrogenasa está codificada por el gen de la base de datos Unipro n.º: AP\_000666 (*E. coli* thrA). Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos codificada por el gen thrA está representada en la SEQ. ID. NO: 29 que tiene una mutación en la posición de aminoácidos 345. La modificación y la potenciación del thrA se lleva a cabo introduciendo la mutación en el gen thrA o introduciendo adicionalmente el gen diana en el cromosoma o introduciendo adicionalmente plásmido procesado.

La O-succinilhomerina que es precursor de L-metionina puede acumularse en una cepa aprovechando una parte del procedimiento entero de la etapa 1 a la etapa 5 anteriores.

La cepa que produce L-metionina se puede preparar a partir de la cepa que produce L-lisina, L-treonina o L-isoleucina. Preferentemente, se puede preparar usando la cepa que produce L-treonina. Con esta cepa, la síntesis de homoserina va siendo más fácil y la producción de precursor de metionina se aumenta como resultado. Por lo tanto, se puede acumular precursor de metionina mediante la eliminación o el debilitamiento de un gen implicado en la ruta de biosíntesis de treonina y luego gen metA o gen metY o gen metZ, utilizando la cepa de producción de L-treonina. Se prefiere más eliminar o debilitar gen thrB primero y luego metB, metY o metZ para sintetizar el precursor de metionina.

La expresión "cepa productora de L-treonina" se refiere a una cepa de microorganismo procarionta o eucarionta que es capaz de producir L-treonina *in vivo*. Por ejemplo, la cepa puede estar incluyendo cepas de microorganismos que producen L-treonina que pertenecen a *Escherichia sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Providencia sp.*, *Corynebacterium sp.* y *Brevibacterium sp.* Entre estos, el microorganismo *Escherichia sp.* se prefiere y *Escherichia coli* se prefiere más.

Se da a conocer que se utilizó CJM002, la cepa que produce L-treonina e independiente de L-metionina transformada a partir de TF4076 (KFCC 10718, patente coreana n.º: 92-8365), la cepa mutante de *E. coli* que produce L-treonina. TF4076 tiene un requerimiento para metionina y es resistente a los análogos de metionina

(ejemplo, ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxivalérico, AHV), análogos de lisina (ejemplo, S-(2-aminoetil)-L-cisteína, AEC) y análogos de isoleucina (ejemplo, ácido  $\alpha$ -aminobutilico). La TF4076 no es capaz de sintetizar metionina *in vivo* ya que es la cepa que tiene un requerimiento para metionina. Para utilizar esta cepa como una cepa que produce el precursor de metionina por libre de un requerimiento de metionina, los autores de la presente invención prepararon la cepa de *E. coli* CJM002 que produce L-treonina libre del requerimiento para metionina por mutación artificial utilizando NTG. La *E. coli* CJM002 se nombró como *Escherichia coli* MF001 y se depositó en el KCCM (Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, Eulim Buld, Hongje-1-Dong, Seodaemun-Ku, Seúl, 361-221, Corea) el 9 de abril de 2004 (número de acceso: KCCM-10568). Los genes *metB*, *thrB*, *metJ* y *metA* de la *E. coli* CJM002 se suprimieron, luego se introdujo el gen *metA* resistente a la retroalimentación. La cepa que produce el precursor de L-metionina resultado construida usando *E. coli* CJM002 se llamó CJM-A11. La cepa CJM-A11 se transformó con el vector de expresión de *thrA* y se llamó CJM-A11 (*pthrA(M)-CL*). La *Escherichia coli* CJM-A11, cepa que produce O-succinilhomoserina, preparada por el procedimiento anterior se depositó el 23 de enero de 2008, con el n.º de acceso KCCM 10922P.

También se da a conocer que se utilizó FTR2533, que es la cepa que produce L-treonina dada a conocer en el documento PCT/KR2005/00344. FTR2533 se derivó de *Escherichia coli* TFR7624 que se derivó de *Escherichia coli* de número de acceso: KCCM10236. Y *Escherichia coli* de n.º de acceso KCCM 10236 que se derivó de *Escherichia coli* TF4076. *Escherichia coli* de n.º de acceso KCCM 10236 es, capaz de expresar niveles más altos de los genes *ppc* que catalizan la formación de oxaloacetato de PEP y las enzimas necesarias para la biosíntesis de treonina a partir de aspartato por ejemplo *thrA*: aspartocinasa 1-homoserina deshidrogenasa, *thrB*: homoserina cinasa, *thrC*: treonina sintasa, permitiendo de este modo un aumento de la producción de L-treonina. Y *Escherichia coli* FTR7624 (KCCM10538) tiene un gen *tyrR* inactivado que vuelve a la expresión del gen *tyrB* necesaria para la biosíntesis de L-treonina. Y *Escherichia coli* FTR2533 (KCCM10541) es la cepa que produce L-treonina que tiene un gen *galR* inactivado, la cepa mutante de *E. coli* que produce L-treonina.

Se eliminaron los genes *metB*, *thrB*, *metJ* y *metA* de la *E. coli* FTR2533, después se introdujo el gen *metA* resistente a la retroalimentación. La cepa que produce el precursor de L-metionina resultado construida usando *E. coli* FTR2533 se llamó CJM-A11. La cepa CJM2-A11 se transformó con el vector de expresión *thrA* y se llamó CJM2-A11 (*pthrA(M)-CL*).

La *Escherichia coli* CJM2-A11 (*pthrA(M)-CL*) se depositó el 12 de febrero de 2008, con el n.º de acceso KCCM 10924P.

Se da a conocer adicionalmente un procedimiento para producir un precursor de L-metionina, comprendiendo el procedimiento: a) fermentación de los microorganismos anteriores; b) enriquecimiento del precursor de L-metionina en el medio o en los microorganismos; y c) aislamiento del precursor de L-metionina.

El cultivo de la cepa que produce el precursor de L-metionina preparada anteriormente puede realizarse por un medio y condiciones adecuados conocidos por aquellos expertos en la técnica. Se entiende bien por los expertos en la técnica que el procedimiento de cultivo se puede utilizar ajustando fácilmente, de acuerdo con la cepa seleccionada. Por ejemplo, el procedimiento de cultivo incluye, pero no está limitado a cultivo por lotes, cultivo continuo y cultivo semicontinuo. Una diversidad de procedimientos de cultivo se describen en la siguiente referencia: "Biochemical Engineering", de James M. Lee, Ediciones Prentice-Hall International, páginas 138-176.

El medio tiene que cumplir las condiciones de cultivo para una cepa específica. Una diversidad de medios de cultivo de microorganismos se describen en la siguiente referencia: "Manual of Methods for General Bacteriology" por la Sociedad Americana de Bacteriología, Washington DC, EE.UU., 1981. Esos medios incluyen diversas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y elementos traza. La fuente de carbono se ejemplifica por hidrato de carbono tal como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, celulosa; grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco, ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como glicerol y etanol y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Uno de estos compuestos o una mezcla de los mismos se pueden utilizar como una fuente de carbono. La fuente de nitrógeno está ejemplificada por fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de maceración del maíz (LMM) y harina de habas y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico y nitrato amónico. Uno de estos compuestos o una mezcla de los mismos se pueden utilizar como una fuente de nitrógeno. El medio en el presente documento puede incluir adicionalmente dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato dipotásico y las correspondientes sales que contienen sodio como fuente de fosfato. El medio también puede incluir una sal metálica tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, los aminoácidos, las vitaminas y los precursores adecuados pueden añadirse también. Los medios o los precursores se pueden añadir al cultivo por lotes o de tipo continuo.

El pH del cultivo se puede ajustar durante el cultivo añadiendo de la manera adecuada un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. La generación de burbujas de aire se puede inhibir durante el cultivo usando un agente antiespumante tal como éster poliglicólico de ácido graso. Para mantener la condición aeróbica del cultivo, se puede inyectar en el cultivo oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire). La temperatura del cultivo es convencionalmente 20 - 45 °C, preferentemente 25 - 40 °C. El período de cultivo puede continuarse hasta que la producción de precursor de L-metionina alcanza un nivel

deseado y el tiempo de cultivo preferible es 10 - 160 horas.

[Ejemplificación]

Realizaciones prácticas y actualmente preferidas de la presente invención son ilustrativas como se muestra en los siguientes ejemplos, que se exponen para ilustrar, pero no deben interpretarse como el límite de la presente invención.

#### Ejemplo 1: Construcción de una cepa que produce precursor de metionina

##### <1-1> Eliminación del gen metB

Para eliminar el gen metB que codifica cistationina sintasa en la cepa de *E. coli*, se realizó una delección por PCR de una sola etapa de FRT (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645). Los cebadores de SEQ. ID. NO: 1 y NO: 2 se utilizaron para la PCR usando el vector pKD3 (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645) como una plantilla, lo que da como resultado la construcción de casete de eliminación. La PCR se realizó como sigue; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto.

El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %, seguido de purificación de ADN obtenido a partir de banda de 1,2 kpb. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en *E. coli* (K12) W3110 transformada con el vector pKD46 (PNAS 2000: vol. 97: P6640-6645). Antes de la electroporación, W3110 transformada con pKD46 se cultivó a 30 °C en medio LB que contenía 100 µg/l de ampicilina y 5 mM de L-arabinosa hasta que la D.O.<sub>600</sub> alcanzó 0,6. A continuación, la cepa cultivada se lavó dos veces con agua destilada esterilizada y una vez más con glicerol al 10 %. La electroporación se realizó a 2.500 V. La cepa recuperada se extendió sobre medio de placa LB que contenía 25 µg/l de cloranfenicol, seguido de cultivo a 37 °C durante la noche. Luego, se seleccionó una cepa que exhibe resistencia a cloranfenicol.

Se realizó la PCR usando la cepa seleccionada como una plantilla con los cebadores n.ºs 1 y 2 en las mismas condiciones. La delección de gen metB se identificó confirmando el gen de tamaño 1,2 kb en gel de agarosa al 1,0 %. Luego la cepa se transformó con el vector pCP20 (PNAS (2000) vol. 97 P6640-6645) y se cultivó en medio LB para eliminar el gen marcador de cloranfenicol. Se construyó la cepa con metB anulado final en la que el tamaño de gen metB se redujo a 150 pb en gel de agarosa al 1,0 % por PCR en las mismas condiciones. La cepa construida se llamó W3-B.

##### <1-2> Eliminación del gen thrB

Los autores de la invención intentaron aumentar la síntesis de O-succinilhomoserina a partir de homoserina mediante la delección del gen thrB que codifica la homoserina cinasa. En particular, cuando la cepa que produce treonina se usa como un huésped de producción de O-succinilhomoserina, la delección del gen thrB es necesaria porque la conversión de homoserina a O-fosfohomoserina por este gen es muy fuerte. Para eliminar el gen thrB en la cepa W3-B construida anteriormente, se realizó la delección por PCR de una sola etapa de FRT de la misma manera que se describió anteriormente para la delección del gen metB.

Para construir el casete de delección de thrB, se realizó una PCR usando el vector pKD4 (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645) como una plantilla con los cebadores de SEQ ID. NO: 3 y NO: 4 de la siguiente manera; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %, seguido de purificación de ADN obtenido de banda de 1,6 kpb. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa W3-B transformada con vector pKD46. La cepa recuperada se extendió sobre medio de placa LB que contiene 50 µg/l de kanamicina, seguido de cultivo a 37 °C durante la noche. Luego, se seleccionó una cepa que presenta resistencia.

Se realizó la PCR usando la cepa seleccionada como una plantilla con cebadores de SEQ. ID. NO: 3 y NO: 4 en las mismas condiciones que la anterior. La delección de gen ThrB se identificó seleccionando la cepa cuyo tamaño es de 1,6 kb en gel de agarosa al 1,0 %. Luego la cepa se transformó con el vector pCP20 y se cultivó en medio LB. Se construyó la cepa con thrB anulado final en la que el tamaño de gen thrB se redujo a 150 kb en gel de agarosa al 1,0 % por PCR en las mismas condiciones. Se confirmó que el marcador de kanamicina se eliminó. La cepa construida se llamó W3-BT.

##### <1-3> Delección del gen metJ

Para eliminar el gen metJ que es el gen regulador del gen metA implicado en la síntesis de precursor de metionina, se realizó delección por PCR de una sola etapa de FRT de la misma manera que se utiliza para la delección del gen metB.

Para construir el casete de eliminación de metJ, se realizó una PCR con los cebadores de SEQ. ID. NO: 5 y NO: 6 de la siguiente manera; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto.

El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0%, seguido de purificación de ADN obtenido

de banda de 1,2 kpb. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa W3-BT transformada con vector pKD46. La cepa recuperada se extendió sobre medio de placa LB que contiene cloranfenicol, seguido de cultivo a 37 °C durante la noche. Luego, se seleccionó una cepa que presenta resistencia.

5 Se realizó una PCR usando la cepa seleccionada como una plantilla con cebadores de SEQ. ID. NO: 7 y NO: 8 en las mismas condiciones que la anterior. La delección de metJ se identificó confirmando el gen de 1,6 kb de tamaño en el gel de agarosa al 1,0 %. Luego la cepa se transformó con el vector pCP20 y se cultivó en medio LB. Se construyó la cepa con metJ anulado final en la que el tamaño del gen metJ se redujo a 600 kb en gel de agarosa al 1,0 % por PCR en las mismas condiciones y el marcador de cloranfenicol de cepa se confirmó que se eliminó. La cepa construida se llamó W3-BTJ.

10 <1-4> Delección del gen metA

Para introducir un gen metA resistente a retroalimentación en el cromosoma, se eliminó el gen metA cromosómico auténtico en la cepa W3-BTJ. Para eliminar el gen metA, se realizó una delección por PCR de una sola etapa de FRT.

15 Para construir casete de eliminación de metA, se realizó una PCR con cebadores de SEQ. ID. NO: 9 y NO: 10 de la siguiente manera; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto.

El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0%, seguido de purificación de ADN obtenido de banda de 1,2 kpb. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa de *E. coli* W3-BTJ transformada con vector pKD46. La cepa recuperada se extendió sobre medio de placa LB que contiene cloranfenicol, seguido de cultivo a 37 °C durante la noche. Luego, se seleccionó una cepa que presenta resistencia.

20 Se realizó PCR usando la cepa seleccionada como una plantilla con cebadores de SEQ. ID. NO: 9 y NO: 10 en las mismas condiciones que la anterior. La delección de gen metA se identificó confirmando el gen de tamaño 1,1 kb en gel de agarosa al 1,0 %. Luego la cepa se transformó con el vector pCP20 y se cultivó en medio LB. Se construyó la cepa con metA anulado final en la que el tamaño de gen metA se redujo a 100 kb en gel de agarosa al 1,0 % por PCR en las mismas condiciones. Se confirmó que el marcador de cloranfenicol se eliminó. La cepa construida se llamó W3-BTJA.

25 <1-5> Introducción de gen metA resistente a retroalimentación

Para aumentar la producción de O-succinilhomoserina que es precursor de L-metionina, se realizó una sobreexpresión de gen metA resistente a retroalimentación que codifica homoserina O-succiniltransferasa. El documento PCT/US2007/009146 da a conocer el procedimiento para preparar gen metA resistente a retroalimentación y la actividad de aquel.

30 La secuencia del gen metA 10 resistente a retroalimentación se representa en la SEQ. ID. NO: 13 y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen está representado en la SEQ. ID. NO: 14. La secuencia del gen metA 11 gen está representada en la SEQ. ID. NO: 15 y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen está representado en la SEQ. ID. NO: 16. La secuencia del gen metA 32 gen está representada en la SEQ. ID. NO: 17 y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen está representada en la SEQ. ID. NO: 18. La secuencia del gen metA 37 gen está representada en la SEQ. ID. NO: 19 y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen está representado en la SEQ. ID. NO: 20. La secuencia del gen metA 41 gen está representada en la SEQ. ID. NO: 21 y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen está representado en la SEQ. ID. NO: 22 (documento PCT/US2007/009146).

40 PCR se realizó usando los genes anteriores como una plantilla con los cebadores de las SEQ. ID. NO: 11 y NO: 12 de la siguiente manera; 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 2 minutos.

45 El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0%, seguido de purificación de ADN obtenido de banda de 1,2 kpb. Después del aislamiento del fragmento de ADN, se escindió el vector pCL 1920 con la enzima de restricción SmaI y se ligó al fragmento de ADN aislado. La *E. coli* se transformó con el vector y las células portadoras de plásmidos se seleccionaron sobre agar LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina. El vector construido se mostró en la Fig. 3.

50 El vector se sometió a electroporación en la cepa W3-BTJA y la capacidad de producción de la cepa se comprobó usando cultivo en matraz Erlenmeyer como se describe en el Ejemplo 2-1. La producción de O-succinilhomoserina de cepa modificada se mide, en base al 100 % de la producción de O-succinilhomoserina de la cepa de tipo silvestre. Como resultado, la producción de O-succinilhomoserina de todas las cepas modificadas se incrementó significativamente con respecto a la de cepas de tipo silvestre, en particular, metA 11, metA 10 y metA 32 muestran la producción más eficaz.

Tabla 1. Resistencia a retroalimentación de metA mutante en presencia de metionina 100 mM.

% de retención de actividad específica	.t.	#10	#11	#32	#37	#41
Control	00	100	100	100	100	100
p/Met 100 mM	0,6	97	94	79	83	74

Tabla 2. Producción de O-succinilhomoserina de metA resistente a retroalimentación en la cepa W3-BTJA.

metA	Producción de O-succinilhomoserina (%)
tipo silvestre	100
# 10	392
# 11	425
# 32	396
# 37	227
# 41	389

Para la expresión estable de los pMetA10-CL, pMetA11-CL y pMetA32-CL que muestran la producción más eficaz, estos genes se insertaron en el cromosoma de E. coli.

5 En primer lugar, el gen marcador de cloranfenicol se amplificó por PCR usando vector pKD3 como una plantilla con los cebadores de las SEQ.. ID. NO: 23 y NO: 24. El fragmento de PCR se aisló por elución de gel. El gen de metA se amplificó por PCR con cebadores de SEQ. ID. NO: 9 y NO: 10 y la región 3'UTR del gen de metA se amplificó por PCR usando el cromosoma de tipo silvestre W3110 como una plantilla con los cebadores de las SEQ. ID. NO: 25 y NO: 26. Cada fragmento de PCR se aisló por elución de gel y la mezcla de fragmentos se amplificó por PCR con cebadores de SEQ. ID. NO: 9 y NO: 26, de este modo se produjo un fragmento del gen metA que contenía un  
10 marcador de cloranfenicol. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa W3BTJA transformada con vector pKD46 y se seleccionaron cepas resistentes a cloranfenicol y se detectó una clonación exitosa de gen metA usando SEQ. ID. NO: 9 y NO: 10. Las cepas identificadas que introdujeron genes metA modificados 10, 11, 32, se llamaron W3BTJ-A10, 11 y 32, respectivamente. La producción de O-succinilhomoserina de cada cepa fue similar a la de la cepa W3-BTJA albergando cada plásmido metA.

15 <1-6> Sobreexpresión de gen thrA

Para aumentar la producción de O-succinilhomoserina de manera más eficiente, se realizó la sobreexpresión de gen thrA.

Para esto, el gen thrA se amplificó por PCR utilizando el cromosoma de E. coli CJM002 (KCCM10568), la cepa que produce L-treonina, como una plantilla con los cebadores de las SEQ. ID. NO: 27 y NO: 28. El fragmento de ADN  
20 amplificado se aisló por elución de gel y se ligó con el promotor CJ1 en el vector pCL1920 utilizando la enzima de restricción EcoRV. La E. coli se transformó con el vector ligado y las células portadoras de plásmidos se seleccionaron en agar LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina. El vector se llamó PCJ-thrA(M)-CL. La secuencia de aminoácidos codificada por el gen thrA está representada en la SEQ ID. NO: 29 que tiene una mutación en la posición aminoacídica 345. Además, el gen thrA de tipo silvestre de cepa de E. coli W3110 se amplificó por PCR de  
25 la misma manera que se describió anteriormente y se clonó en el vector llamado pCJ-thrA-CL. Los vectores se sometieron a electroporación en W3BTJ-A11 respectivamente y la producción de O-succinilhomoserina de cada cepa se comprobó usando el procedimiento de cultivo en matraz tal como se describe en el Ejemplo 2-1. Como resultado, la cepa transformada con el vector que contiene el gen thrA en forma mutante acumuló niveles significativamente altos de O-succinilhomoserina.

30 Tabla 3. Producción de O-succinilhomoserina en presencia del vector de expresión thrA.

	Plásmido	Producción de OSH (%)
W3BTJA11	pCL1920	100
	pCJ-thrA-CL	119
	PCJ-thrA (M)-CL	153

<1-7> Conversión de cepa de producción de L-treonina

La cepa que produce O-succinilhomoserina se construyó utilizando E. coli CJM002(KCCM10568) que es la cepa que produce L-treonina e independiente de L-metionina, como se describe en el Ejemplo 1-1 a 1-5. La cepa que contiene el gen metA mutante en el cromosoma se llamó CJM-A10, A11-CJM y CJM-A32, respectivamente. Y otra cepa de  
35 producción de precursor de L-metionina se construyó utilizando la cepa FTR2533 (KCCM10541) dada a conocer en el documento PCT/KR2005/00344 por el anterior Ejemplo 1-1 a 1-5 y nombrada como CJM2-A11. Cada cepa se transformó con el vector de expresión de thrA como se describe en el Ejemplo 1-6. La producción de precursor de

metionina de estas cepas se midió por el procedimiento de cultivo en matraz descrito en el ejemplo 2-1. Como resultado, CJM-A11 que alberga plásmido pCJ-thrA(m)-CL mostró significativamente mayor producción de O-succinilhomoserina.

[Tabla 4] Producción de precursor de metionina (O-succinilhomoserina) por cultivo en matraz

	<i>O-succinilhomoserina (%)</i>
CJM-A10	100
CJM-A11	113
CJM-A32	80
CJM2-A11	94
CJM-A11 (PCJ-thrA(m)-CL)	127

5 Ejemplo 2: Fermentación para la producción de precursor de L-metionina

<2-1> Experimento de cultivo en matraz

Para medir la producción de precursor de metionina de cada cepa construida en el Ejemplo 1, se llevó a cabo un cultivo en matraz Erlenmeyer. Cada cepa se cultivó en medios de placa LB a 31 °C durante la noche. Una sola colonia se inoculó en 3 ml de medio LB, seguido de cultivo a 31 °C durante 5 horas. La solución de cultivo se diluyó 200 veces en matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 25 ml de medio de producción de precursor de metionina, seguido de cultivo a 31 °C, a 200 rpm durante 64 horas. Se realizó HPLC para comparar con la capacidad de producción de precursor de metionina (Tabla 2 y Tabla 3). Como resultado, la capacidad de producción de metionina estaba significativamente aumentada en la cepa precursora que produce metionina preparada a partir de la cepa que produce L-treonina libre de la necesidad de metionina.

15 [Tabla 1]

Composición de medio de matraz para la producción de precursor de metionina

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	40 g
Sulfato de amonio	17 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	5 mg
ZnSO <sub>4</sub> • 8H <sub>2</sub> O	5 mg
ZnSO <sub>4</sub>	5 mg
Carbonato de calcio	30 g
Extracto de levadura	2 g
Metionina	0,15 g
Treonina	0,15 g

<2-2> Fermentación a gran escala

Unas pocas cepas que muestran mayor capacidad de producción de O-succinilhomoserina se seleccionaron y se cultivaron en un fermentador de 5 l para producir en masa O-succinilhomoserina. Cada cepa se inoculó en medio LB que contenía espectinomicina, seguido de cultivo a 31 °C durante la noche. Luego, una sola colonia se inoculó en 10 ml de medio LB que contenía espectinomicina, que se cultivó a 31 °C durante 5 horas. La solución de cultivo se diluyó 100 veces en matraz Erlenmeyer de 1000 ml que contenía 200 ml de medio de siembra de precursor de metionina, seguido de cultivo a 31 °C, a 200 rpm durante 3-10 horas. La solución de cultivo se inoculó en un fermentador de 5 l, seguido por cultivo adicional durante 20-100 horas por fermentación semicontinua. La concentración de precursor de metionina en la solución fermentada se midió mediante HPLC y los resultados se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 3]

Composición de medio fermentador para la producción de precursor de metionina

Composición	Medios de siembra	Medios principales	Medios de alimentación
Glucosa (g/l)	10,1	40	600
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/l)	0,5	4,2	
Extracto de levadura (g/l)	10	3,2	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	3	8
Sulfato de amonio (g/l)		6,3	
NH <sub>4</sub> Cl (g/l)	1		
NaCl (g/l)	0,5		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O (g)	5,07		
DL-metionina (g/l)		0,5	0,5
L-isoleucina (g/l)	0,05	0,5	0,5
L-treonina (g/l)		0,5	0,5

[Tabla 4] Producción de precursor de metionina en un fermentador

	<i>O-succinilhomoserina (g/l)</i>
CJM-BTJ/pCJ-MetA-CL	>80
CJM-A11/PCJ-thrA(M) -CL	>100
CJM2-A11/PCJ-thrA(M)-CL	>90

[Aplicabilidad industrial]

5 Como se ha descrito hasta ahora, utilizando el precursor de metionina en la cepa productora de presente invención, se puede producir metionina de modo más respetuoso con el medio ambiente que el procedimiento de síntesis de metionina químico convencional. Y la L-metionina convertida a partir de O-succinilhomoserina producida a partir de la cepa de acuerdo con la presente invención puede utilizarse ampliamente en la producción de piensos para animales o de aditivos para piensos para animales, además de en la producción de alimentos para seres humanos o de aditivos alimentarios para seres humanos.

**Listado de secuencias**

10 <110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> MICROORGANISMO QUE PRODUCE PRECURSOR DE L-METIONINA Y EL PROCEDIMIENTO DE PRODUCIR PRECURSOR DE L-METIONINA UTILIZANDO EL MICROORGANISMO

15 <130> CHE-P934EP

<140> EP08157324.6

<141> 3-4-2.009

20 <150> US12/052927

<151> 4-4-2.009

<160> 30

25 <170> Kopatent In 1.71

ES 2 599 911 T3

<210> 1  
<211> 70  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<230> cebador para amplificación de cloranfenicol

10 <400> 1  
ttactctggt gcctgacatt tcaccgacaa agcccagga acttcatcac gtgtaggctg 60  
gagctgcttc 70

<210> 2  
<211> 70  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para amplificación de cloranfenicol

20 <400> 2  
ttacccttg ttgagccc ggaagccatt ttccaggctg gcaattaaat catatgaata 60  
tcctccttag 70

<210> 3  
25 <211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> cebador para amplificación de kanamicina

<400> 3

ES 2 599 911 T3

aaagaatatg ccgatcgggt cgggcttagg ctccagtgcc tgttcgggtg gtgtaggctg 60  
gagctgcttc 70

<210> 4  
<211> 70  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para amplificación de kanamicina  
10

<400> 4  
agacaaccga catcgctttc aacattggcg accggagccg ggaaggcaaa catatgaata 60  
tcctccttag 70

<210> 5  
15 <211> 71  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> cebador para amplificación de cloranfenicol

<400> 5  
atggctgaat ggagcggcga atatcagc ccatcagctg agcacggcaa ggtgtaggct 60  
ggagctgctt c 71

25 <210> 6  
<211> 65  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> cebador para amplificación de cloranfenicol

<400> 6

ES 2 599 911 T3

gtattccac gtctccgggt taatcccat ctcacgatg atctccatat gaatatcctc 60  
cttag 65

<210> 7  
<211> 19  
5 <212> ADN  
<213> Escherichia coli

<220>  
<221> misc\_feature  
10 <222> (1)..(19)  
<223> cebador para amplificación de metJ

<400> 7  
gggctttgtc ggtgaaatg 19

15  
<210> 8  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli

20  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(19)  
<223> cebador para amplificación de metJ

25  
<400> 8  
actttgcat gagcgagag 19

<210> 9  
30 <211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> cebador para delección de metA

# ES 2 599 911 T3

<440> 9  
caatttcttg cgtgaagaaa acgtctttgt gatgacaact tctcgtgcgt gtgtaggctg 60  
gagctgcttc 70

5 <210> 10  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> cebador para delección de metA

<400> 10  
aatccagcgt tggattcatg tgccgtagat cgtatggcgt gatctggtag catatgaata 60  
15 tcctccttag 70

<210> 11  
<211> 28  
<212> ADN  
20 <213> Escherichia coli

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(28)  
25 <223> cebador para amplificación de metA

<400> 11  
aatggatcct gccgtgagcg gcgaatac 28

30 <210> 12  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli

ES 2 599 911 T3

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(28)

<223> cebador para amplificación de meta

5

<400> 12

agctctagac tgctgaggta cgtttcgg

28

<210> 13

10 <211> 930

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 13

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctgga agaaaacgtc 60

tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccgcttaa ggttctgatc 120

cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac 180

tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacatgatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240

cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300

gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggccctgggtg agtttaatga tgtcgccttac 360

tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420

gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480

accgaacaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540

cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggctgcg 600

ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660

ctgttagcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720

caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg 780

tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840

ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accggatcac gccatacgat 900

15

ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa

930

<210> 14

<211> 309

<212> PRT

20 <213> Escherichia coli

ES 2 599 911 T3

<400> 14

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu  
 20 25 30  
 Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile  
 35 40 45  
 Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln  
 50 55 60  
 Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln  
 85 90 95  
 Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu  
 100 105 110  
 Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu  
 115 120 125  
 Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala  
 130 135 140  
 Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Gln Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His  
 165 170 175  
 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser  
 180 185 190  
 Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu  
 195 200 205  
 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Leu Ala Ser  
 210 215 220  
 Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala  
 225 230 235 240  
 Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp  
 245 250 255  
 Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr  
 260 265 270  
 Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp  
 275 280 285  
 Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Arg Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met  
 290 295 300  
 Asn Pro Thr Leu Asp  
 305

5

<210> 15

<211> 930

ES 2 599 911 T3

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 15

```
atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgatga agaaaacgtc      60
tttgtgatgt caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgac      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacgatt ctcgtgaatc gcgcaacacg      240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgtcgcttac      360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt      420
gtctgctggg cggtagaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggccttg atgattcatt cctggcaccg cttcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagagagctg gcgtagtcac      840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcgc gccatacgat      900
5 ctacggcaca tgtatccaac gctggattaa      930
```

<210> 16

<211> 309

<212> PRT

10 <213> Escherichia coli

<400> 16

ES 2 599 911 T3

Met 1 Pro Ile Arg Val 5 Pro Asp Glu Leu Pro 10 Ala Val Asn Phe Leu Arg  
 Glu Glu Asn Val 20 Phe Val Met Ser Thr 25 Ser Arg Ala Ser Gly 30 Gln Glu  
 Ile Arg Pro 35 Leu Lys Val Leu Ile 40 Leu Asn Leu Met Pro 45 Lys Lys Ile  
 Glu Thr 50 Glu Asn Gln Phe Leu 55 Arg Leu Leu Ser Asn 60 Ser Pro Leu Gln  
 Val 65 Asp Ile Gln Leu Leu 70 Arg Ile Asp Ser Arg 75 Glu Ser Arg Asn Thr 80  
 Pro Ala Glu His Leu 85 Asn Asn Phe Tyr Cys 90 Asn Phe Glu Asp Ile 95 Gln  
 Asp Gln Asn Phe 100 Asp Gly Leu Ile Val 105 Thr Gly Ala Pro Leu 110 Gly Leu  
 Val Glu Phe 115 Asn Asp Val Ala Tyr 120 Trp Pro Gln Ile Lys 125 Gln Val Leu  
 Glu Trp 130 Ser Lys Asp His Val 135 Thr Ser Thr Leu Phe Val 140 Cys Trp Ala  
 Val 145 Gln Ala Ala Leu Asn 150 Ile Leu Tyr Gly Ile 155 Pro Lys Gln Thr Arg 160  
 Thr Glu Lys Leu Ser 165 Gly Val Tyr Glu His 170 His Ile Leu His Pro 175 His  
 Ala Leu Leu Thr 180 Arg Gly Phe Asp Asp 185 Ser Phe Leu Ala Pro 190 His Ser  
 Arg Tyr Ala 195 Asp Phe Pro Ala Ala 200 Leu Ile Arg Asp Tyr 205 Thr Asp Leu  
 Glu Ile 210 Leu Ala Glu Thr Glu 215 Glu Gly Asp Ala Tyr 220 Leu Phe Ala Ser  
 Lys 225 Asp Lys Arg Ile Ala 230 Phe Val Thr Gly His 235 Pro Glu Tyr Asp Ala 240  
 Gln Thr Leu Ala Gln 245 Glu Phe Phe Arg Asp 250 Val Glu Ala Gly Leu Asp 255  
 Pro Asp Val 260 Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro 265 His Asn Asp Pro Gln 270 Asn Thr  
 Pro Arg Glu 275 Ser Trp Arg Ser His 280 Gly Asn Leu Leu Phe 285 Thr Asn Trp  
 Leu 290 Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln 295 Ile Ala Pro Tyr Asp 300 Leu Arg His Met  
 Tyr 305 Pro Thr Leu Asp

<210> 17

<211> 930

5 <212> ADN

<213> Escherichia coli

ES 2 599 911 T3

<400> 17

atgccgattc	gtgtgccgga	cgagctaccc	gccgtcaatt	tcttgcgga	agaaaacgtc	60
tttgtgatga	caacttctcg	tgcgtctggt	caggaaattc	gtccacttaa	ggttctgatc	120
cttaacctga	tgccgaagaa	gattgaaact	gaaaatcagt	ttctgcgctt	gctttcaaac	180
tcacctttgc	aggtcgatat	tcagctggtg	cgcatcgatt	cccgtgaatc	gcgcaacacg	240
cccgcagagc	atctgaacaa	cttctactgt	aactttgaag	atattcagga	tcagaacttt	300
gacggtttga	ttgtaactgg	tgcgccgctg	ggcctgggtg	agtttaatga	tgctcgcttac	360
tggccgcaga	tcaaacaggt	gctggagtgg	tcgaaagatc	acgtcacctc	gacgctgttt	420
gtctgctggg	cggtacaggc	cgcgctcaac	atcctctacg	gcattcctaa	gcaaactcgc	480
accgaaaaac	tctctggcgt	ttacgagcat	catattctcc	atcctcatgc	gcttctgacg	540
cgtggctttg	atgattcatt	cctggcaccg	cattcgcgct	atgctgactt	tccggcagcg	600
ttgattcgtg	attacaccga	tctggaaatt	ctggcagaga	cggaagaagg	ggatgcatat	660
ctgtttgcca	gtaaagataa	gcgcattgcc	tttgtgacgg	gccatcccga	atatgatgcg	720
caaacgctgg	cgcaggaatt	tttccgcgat	gtggaagccg	gactagaccc	ggatgtaccg	780
tataactatt	tcccgcacaa	tgatccgcaa	aatacaccgc	gagcgagctg	gcgtagtcac	840
ggtaatttac	tgtttaccaa	ctggctccac	tattacgtct	accagatcac	gccatacgat	900
ctacggcaca	tgaatccaac	gctggattaa				930

5 <210> 18

<211> 309

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10 <400> 18

ES 2 599 911 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu  
 20 25 30  
 Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile  
 35 40 45  
 Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln  
 50 55 60  
 Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln  
 85 90 95  
 Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu  
 100 105 110  
 Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu  
 115 120 125  
 Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala  
 130 135 140  
 Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His  
 165 170 175  
 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser  
 180 185 190  
 Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu  
 195 200 205  
 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser  
 210 215 220  
 Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala  
 225 230 235 240  
 Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp  
 245 250 255  
 Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr  
 260 265 270  
 Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp  
 275 280 285  
 Leu His Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met  
 290 295 300  
 Asn Pro Thr Leu Asp  
 305

<210> 19

5 <211> 930

<212> ADN

<213> Escherichia coli

ES 2 599 911 T3

<400> 19

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc	60
tttgtgatga caacttctcg tgcgcctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgac	120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac	180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg	240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt	300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg ggtttaatga tgtcgcttac	360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtct	420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc	480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg	540
cgthggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg	600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat	660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg	720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg	780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac	840
ggtaatttac tgttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat	900
ctacggcaca tgaaccaac gctggattaa	930

5

<210> 20

<211> 309

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 20

ES 2 599 911 T3

Met<sub>1</sub> Pro Ile Arg Val<sub>5</sub> Pro Asp Glu Leu Pro<sub>10</sub> Ala Val Asn Phe Leu<sub>15</sub> Arg  
 Glu Glu Asn Val<sub>20</sub> Phe Val Met Thr Thr<sub>25</sub> Ser Arg Ala Pro Gly<sub>30</sub> Gln Glu  
 Ile Arg Pro<sub>35</sub> Leu Lys Val Leu Ile<sub>40</sub> Leu Asn Leu Met Pro<sub>45</sub> Lys Lys Ile  
 Glu Thr<sub>50</sub> Glu Asn Gln Phe Leu<sub>55</sub> Arg Leu Leu Ser Asn<sub>60</sub> Ser Pro Leu Gln  
 Val<sub>65</sub> Asp Ile Gln Leu Leu<sub>70</sub> Arg Ile Asp Ser Arg<sub>75</sub> Glu Ser Arg Asn Thr<sub>80</sub>  
 Pro Ala Glu His Leu<sub>85</sub> Asn Asn Phe Tyr Cys<sub>90</sub> Asn Phe Glu Asp Ile<sub>95</sub> Gln  
 Asp Gln Asn Phe<sub>100</sub> Asp Gly Leu Ile Val<sub>105</sub> Thr Gly Ala Pro Leu<sub>110</sub> Gly Leu  
 Val Gly Phe<sub>115</sub> Asn Asp Val Ala Tyr<sub>120</sub> Trp Pro Gln Ile Lys<sub>125</sub> Gln Val Leu  
 Glu Trp<sub>130</sub> Ser Lys Asp His Val<sub>135</sub> Thr Ser Thr Leu Ser<sub>140</sub> Val Cys Trp Ala  
 Val<sub>145</sub> Gln Ala Ala Leu Asn<sub>150</sub> Ile Leu Tyr Gly Ile<sub>155</sub> Pro Lys Gln Thr Arg<sub>160</sub>  
 Thr Glu Lys Leu Ser<sub>165</sub> Gly Val Tyr Glu His<sub>170</sub> His Ile Leu His Pro<sub>175</sub> His  
 Ala Leu Leu Thr<sub>180</sub> Arg Gly Phe Asp Asp<sub>185</sub> Ser Phe Leu Ala Pro<sub>190</sub> His Ser  
 Arg Tyr Ala<sub>195</sub> Asp Phe Pro Ala Ala<sub>200</sub> Leu Ile Arg Asp Tyr<sub>205</sub> Thr Asp Leu  
 Glu Ile<sub>210</sub> Leu Ala Glu Thr Glu<sub>215</sub> Glu Gly Asp Ala Tyr<sub>220</sub> Leu Phe Ala Ser  
 Lys Asp Lys Arg Ile Ala<sub>230</sub> Phe Val Thr Gly His<sub>235</sub> Pro Glu Tyr Asp Ala<sub>240</sub>  
 Gln Thr Leu Ala Gln<sub>245</sub> Glu Phe Phe Arg Asp Val<sub>250</sub> Glu Ala Gly Leu Asp<sub>255</sub>  
 Pro Asp Val<sub>260</sub> Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro<sub>265</sub> His Asn Asp Pro Gln<sub>270</sub> Asn Thr  
 Pro Arg Ala<sub>275</sub> Ser Trp Arg Ser His<sub>280</sub> Gly Asn Leu Leu Phe<sub>285</sub> Thr Asn Trp  
 Leu Asn<sub>290</sub> Tyr Tyr Val Tyr Gln<sub>295</sub> Ile Thr Pro Tyr Asp<sub>300</sub> Leu Arg His Met  
 Asn Pro Thr Leu Asp  
 305

<210> 21

5 <211> 930

<212> ADN

<213> Escherichia coli

ES 2 599 911 T3

<400> 21

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgac      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcagcacg      240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgtcgtttac      360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgatt      420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggccttg atgattcatt cctggcaccg cactcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac      840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac aattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcact tgaatccaac gctggattaa      930

```

5 <210> 22

<211> 309

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10 <400> 22

```

Met Pro Ile Arg Val5 Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
 1          5          10          15
Glu Glu Asn Val20 Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu
          20          25          30
Ile Arg Pro35 Leu Lys Val Leu Ile40 Leu Asn Leu Met Pro45 Lys Lys Ile
          35          40          45
Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu55 Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln
          50          55          60
Val Asp Ile Gln Leu Leu70 Arg Ile Asp Ser Arg75 Glu Ser Arg Ser Thr
          65          70          75          80
Pro Ala Glu His Leu85 Asn Asn Phe Tyr Cys90 Asn Phe Glu Asp Ile Gln
          85          90          95
Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu

```

ES 2 599 911 T3

	100		105		110										
Val	Glu	Phe	Asn	Asp	Val	Ala	Tyr	Trp	Pro	Gln	Ile	Lys	Gln	Val	Leu
		115					120					125			
Glu	Trp	Ser	Lys	Asp	His	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Ile	Val	Cys	Trp	Ala
	130					135					140				
Val	Gln	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ile	Pro	Lys	Gln	Thr	Arg
145					150					155					160
Thr	Glu	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Tyr	Glu	His	His	Ile	Leu	His	Pro	His
				165					170					175	
Ala	Leu	Leu	Thr	Arg	Gly	Phe	Asp	Asp	Ser	Phe	Leu	Ala	Pro	His	Ser
			180					185					190		
Arg	Tyr	Ala	Asp	Phe	Pro	Ala	Ala	Leu	Ile	Arg	Asp	Tyr	Thr	Asp	Leu
		195					200					205			
Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Tyr	Leu	Phe	Ala	Ser
	210					215					220				
Lys	Asp	Lys	Arg	Ile	Ala	Phe	Val	Thr	Gly	His	Pro	Glu	Tyr	Asp	Ala
225					230					235					240
Gln	Thr	Leu	Ala	Gln	Glu	Phe	Phe	Arg	Asp	Val	Glu	Ala	Gly	Leu	Asp
				245					250					255	
Pro	Asp	Val	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Phe	Pro	His	Asn	Asp	Pro	Gln	Asn	Thr
			260					265					270		
Pro	Arg	Ala	Ser	Trp	Arg	Ser	His	Gly	Asn	Leu	Leu	Phe	Thr	Asn	Trp
		275					280					285			
Leu	Asn	Asn	Tyr	Val	Tyr	Gln	Ile	Thr	Pro	Tyr	Asp	Leu	Arg	His	Leu
	290					295					300				
Asn	Pro	Thr	Leu	Asp											
	305														

<210> 23

<211> 42

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para integración de metA

10

<400> 23

tttccgaaac gtacctcagc aggtgtaggc tggagctgct tc

42

<210> 24

15 <211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para integración de metA

5

<400> 24

gaataaaatt tattcacctg ctgcatatga atatcctcct tag 43

<210> 25

10 <211> 23

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

15 <221> misc\_feature

<222> (1)..(23)

<223> cebador para integración de metA

<400> 25

20 cagcaggtga ataaatttta ttc 23

<210> 26

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Escherichia coli

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

30 <223> cebador para integración de metA

<400> 26

cgcgaatgga agctgtttcc 20

35 <210> 27

<211> 32

ES 2 599 911 T3

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

5 <221> misc\_feature

<222> (1)..(32)

<223> cebador para amplificación de thrA

<400> 27

10 ctggcaaagc tttcaaagga aaactccttc gt

32

<210> 28

<211> 32

<212> ADN

15 <213> Escherichia coli

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(32)

20 <223> cebador para amplificación de thrA

<400> 28

agtcgtgata tcatgcgagt gttgaagttc gg

32

25 <210> 29

<211> 820

<212> PRT

<213> Escherichia coli

30 <220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(820)

<223> homoserina deshidrogenasa fusionada con aspartato cinasa

35 <400> 29

ES 2 599 911 T3

Met Arg Val Leu Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Ala Glu Arg  
 1 5 10 15  
 Phe Leu Arg Val Ala Asp Ile Leu Glu Ser Asn Ala Arg Gln Gly Gln  
 20 25 30  
 Val Ala Thr Val Leu Ser Ala Pro Ala Lys Ile Thr Asn His Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Met Ile Glu Lys Thr Ile Ser Gly Gln Asp Ala Leu Pro Asn Ile  
 50 55 60  
 Ser Asp Ala Glu Arg Ile Phe Ala Glu Leu Leu Thr Gly Leu Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Gln Pro Gly Phe Pro Leu Ala Gln Leu Lys Thr Phe Val Asp Gln  
 85 90 95  
 Glu Phe Ala Gln Ile Lys His Val Leu His Gly Ile Ser Leu Leu Gly  
 100 105 110  
 Gln Cys Pro Asp Ser Ile Asn Ala Ala Leu Ile Cys Arg Gly Glu Lys  
 115 120 125  
 Met Ser Ile Ala Ile Met Ala Gly Val Leu Glu Ala Arg Gly His Asn  
 130 135 140  
 Val Thr Val Ile Asp Pro Val Glu Lys Leu Leu Ala Val Gly His Tyr  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Ser Thr Val Asp Ile Ala Glu Ser Thr Arg Arg Ile Ala Ala  
 165 170 175  
 Ser Arg Ile Pro Ala Asp His Met Val Leu Met Ala Gly Phe Thr Ala  
 180 185 190  
 Gly Asn Glu Lys Gly Glu Leu Val Val Leu Gly Arg Asn Gly Ser Asp  
 195 200 205  
 Tyr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ala Asp Cys Cys Glu  
 210 215 220  
 Ile Trp Thr Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Cys Asp Pro Arg Gln Val  
 225 230 235 240  
 Pro Asp Ala Arg Leu Leu Lys Ser Met Ser Tyr Gln Glu Ala Met Glu  
 245 250 255  
 Leu Ser Tyr Phe Gly Ala Lys Val Leu His Pro Arg Thr Ile Thr Pro  
 260 265 270  
 Ile Ala Gln Phe Gln Ile Pro Cys Leu Ile Lys Asn Thr Gly Asn Pro  
 275 280 285  
 Gln Ala Pro Gly Thr Leu Ile Gly Ala Ser Arg Asp Glu Asp Glu Leu  
 290 295 300  
 Pro Val Lys Gly Ile Ser Asn Leu Asn Asn Met Ala Met Phe Ser Val  
 305 310 315 320  
 Ser Gly Pro Gly Met Lys Gly Met Val Gly Met Ala Ala Arg Val Phe  
 325 330 335  
 Ala Ala Met Ser Arg Ala Arg Ile Phe Val Val Leu Ile Thr Gln Ser  
 340 345 350  
 Ser Ser Glu Tyr Ser Ile Ser Phe Cys Val Pro Gln Ser Asp Cys Val

ES 2 599 911 T3

	355					360					365				
Arg	Ala	Glu	Arg	Ala	Met	Gln	Glu	Glu	Phe	Tyr	Leu	Glu	Leu	Lys	Glu
	370					375					380				
Gly	Leu	Leu	Glu	Pro	Leu	Ala	Val	Thr	Glu	Arg	Leu	Ala	Ile	Ile	Ser
385					390					395					400
Val	Val	Gly	Asp	Gly	Met	Arg	Thr	Leu	Arg	Gly	Ile	Ser	Ala	Lys	Phe
				405					410					415	
Phe	Ala	Ala	Leu	Ala	Arg	Ala	Asn	Ile	Asn	Ile	Val	Ala	Ile	Ala	Gln
			420					425					430		
Gly	Ser	Ser	Glu	Arg	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Val	Asn	Asn	Asp	Asp	Ala
		435					440					445			
Thr	Thr	Gly	Val	Arg	Val	Thr	His	Gln	Met	Leu	Phe	Asn	Thr	Asp	Gln
	450					455					460				
Val	Ile	Glu	Val	Phe	Val	Ile	Gly	Val	Gly	Gly	Val	Gly	Gly	Ala	Leu
465					470					475					480
Leu	Glu	Gln	Leu	Lys	Arg	Gln	Gln	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Lys	His	Ile
				485					490					495	
Asp	Leu	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Ala	Asn	Ser	Lys	Ala	Leu	Leu	Thr	Asn
			500					505					510		
Val	His	Gly	Leu	Asn	Leu	Glu	Asn	Trp	Gln	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala
		515					520					525			
Lys	Glu	Pro	Phe	Asn	Leu	Gly	Arg	Leu	Ile	Arg	Leu	Val	Lys	Glu	Tyr
	530					535					540				
His	Leu	Leu	Asn	Pro	Val	Ile	Val	Asp	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Ala	Val
545					550					555					560
Ala	Asp	Gln	Tyr	Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Glu	Gly	Phe	His	Val	Val	Thr
				565					570					575	
Pro	Asn	Lys	Lys	Ala	Asn	Thr	Ser	Ser	Met	Asp	Tyr	Tyr	His	Gln	Leu
			580					585					590		
Arg	Tyr	Ala	Ala	Glu	Lys	Ser	Arg	Arg	Lys	Phe	Leu	Tyr	Asp	Thr	Asn
		595					600					605			
Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Pro	Val	Ile	Glu	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Leu	Asn
	610					615					620				
Ala	Gly	Asp	Glu	Leu	Met	Lys	Phe	Ser	Gly	Ile	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu
625					630					635					640
Ser	Tyr	Ile	Phe	Gly	Lys	Leu	Asp	Glu	Gly	Met	Ser	Phe	Ser	Glu	Ala
				645					650					655	
Thr	Thr	Leu	Ala	Arg	Glu	Met	Gly	Tyr	Thr	Glu	Pro	Asp	Pro	Arg	Asp
			660					665					670		
Asp	Leu	Ser	Gly	Met	Asp	Val	Ala	Arg	Lys	Leu	Leu	Ile	Leu	Ala	Arg
		675					680					685			
Glu	Thr	Gly	Arg	Glu	Leu	Glu	Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Ile	Glu	Pro	Val
	690					695					700				
Leu	Pro	Ala	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	Phe	Met	Ala
705					710					715					720
Asn	Leu	Ser	Gln	Leu	Asp	Asp	Leu	Phe	Ala	Ala	Arg	Val	Ala	Lys	Ala

ES 2 599 911 T3

				725						730										735
Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Val	Leu	Arg	Tyr	Val	Gly	Asn	Ile	Asp	Glu	Asp					
			740					745					750							
Gly	Val	Cys	Arg	Val	Lys	Ile	Ala	Glu	Val	Asp	Gly	Asn	Asp	Pro	Leu					
		755					760					765								
Phe	Lys	Val	Lys	Asn	Gly	Glu	Asn	Ala	Leu	Ala	Phe	Tyr	Ser	His	Tyr					
	770					775					780									
Tyr	Gln	Pro	Leu	Pro	Leu	Val	Leu	Arg	Gly	Tyr	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp					
	785				790					795					800					
Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Val	Phe	Ala	Asp	Leu	Leu	Arg	Thr	Leu	Ser	Trp					
				805					810					815						
Lys	Leu	Gly	Val																	
			820																	

<210> 30

<211> 309

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (1)..(309)

<223> homoserina O-succiniltransferasa

<400> 30

ES 2 599 911 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu  
 20 25 30  
 Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile  
 35 40 45  
 Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln  
 50 55 60  
 Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln  
 85 90 95  
 Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu  
 100 105 110  
 Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu  
 115 120 125  
 Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala  
 130 135 140  
 Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His  
 165 170 175  
 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser  
 180 185 190  
 Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu  
 195 200 205  
 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser  
 210 215 220  
 Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala  
 225 230 235 240  
 Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp  
 245 250 255  
 Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr  
 260 265 270  
 Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp  
 275 280 285  
 Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met  
 290 295 300  
 Asn Pro Thr Leu Asp  
 305

**REIVINDICACIONES**

1. Un microorganismo derivado de *Escherichia sp.* para la producción de O-succinilhomoserina, en el que dicho microorganismo:
  - (i) comprende una homoserina O-succiniltransferasa resistente a inhibición por retroalimentación de metionina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 14, 16, 18, 20 o 22;
  - (ii) tiene una aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa que tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID No: 29; y
  - (iii) tiene una actividad cistationina gamma sintasa que esta inactivada.
2. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que la O-succinilhomoserina sulfhidrilasa , o la O-succinilhomoserina sulfhidrilasa está inactivada.
3. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se deriva de una cepa de producción de L-treonina, L-isooleucina o L-lisina.
4. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.
5. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que la actividad intracelular de la homoserina cinasa está inactivada.
6. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que el regulador de la transcripción de rutas de síntesis de metionina está inactivado.
7. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que el gen metB que codifica la cistationina gamma sintasa, el gen thrB que codifica la homoserina cinasa y el gen de metJ que es regulador de la transcripción del gen metA están inactivados.
8. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se deriva de la cepa de *Escherichia coli* MF001 que produce treonina libre de dependencia de metionina, depositada con el n.º de acceso: KCCM 10568.
9. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se deriva de la cepa de *Escherichia coli* FTR2533 que produce treonina, depositada con el n.º de acceso: KCCM 10541.
10. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Escherichia coli* CJM-A11(pthrA(m)-CI), depositada con el n.º de acceso: KCCM 10922P, la cepa que produce O-succinilhomoserina.
11. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Escherichia coli* CJM2-A11(pthrA(m)-CI), depositada con el n.º de acceso: KCCM 10924P, la cepa que produce O-succinilhomoserina.
12. Un procedimiento de producción de O-succinilhomoserina, comprendiendo el procedimiento:
  - a) fermentación de los microorganismos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
  - b) enriquecimiento de la O-succinilhomoserina en el medio o en los microorganismos; y
  - c) aislamiento de la O-succinilhomoserina.



Figura 2

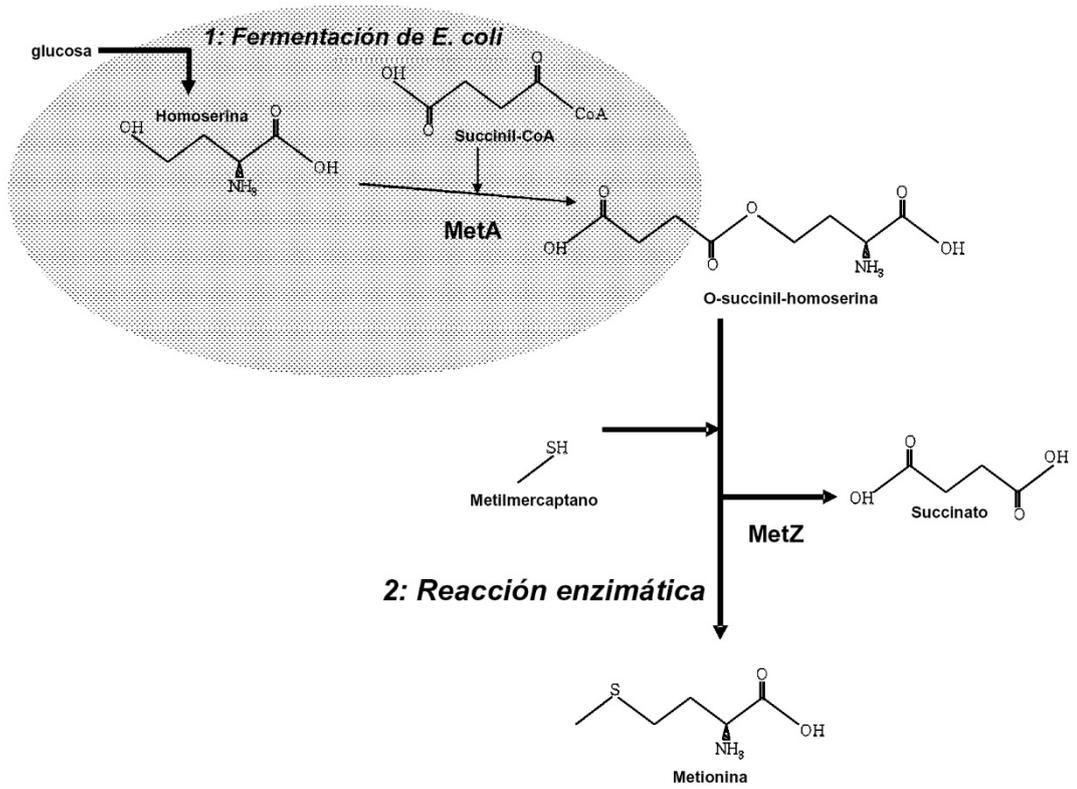


Figura 3

