

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 540**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/21</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/02</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/10</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/12</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/88</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/54</b>	(2006.01)
<b>C12P 13/06</b>	(2006.01)
<b>C12P 13/12</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2010 E 10250455 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2290051**

54 Título: **Microorganismo productor de O-acetil-homoserina y el método de producción de O-acetil-homoserina usando el microorganismo**

30 Prioridad:

**28.08.2009 US 550121**

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

**24.03.2017**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
500 Namdaemunro 5-ga  
Jung-gu, Seoul 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SO YOUNG;  
SHIN, YONG UK;  
HEO, IN KYUNG;  
KIM, HYUN AH;  
SEO, CHANG IL;  
KIM, JU EUN;  
SON, SUNG KWANG;  
LEE, SANG MOK;  
JHON, SUNG HOO;  
LEE, HAN JIN y  
NA, KWANG HO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 606 540 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 productor de O-acetil-homoserina y el método de producción de O-acetil-homoserina usando el microorganismo

5

**Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una cepa de *Escherichia sp.*, capaz de producir O-acetil homoserina con alto rendimiento. Además, la presente invención se refiere a un método de producción de O-acetil homoserina usando la cepa.

**2. Descripción de la técnica relacionada**

15

La metionina para uso en alimentación animal, alimentos y medicinas puede sintetizarse química o biológicamente.

En la ruta de síntesis química, por lo general, la metionina se produce mediante la hidrólisis de 5-(β-metilmercaptoetil)-hidantoína. Sin embargo, la metionina sintetizada está desventajosamente presente en una mezcla de formas L y D que necesita un difícil proceso adicional para separarlas entre sí. Con el fin de resolver este problema, los inventores de la presente invención desarrollaron un método biológico para sintetizar selectivamente L-metionina, un producto químico, para el que ya se ha solicitado una patente (WO 2008/103432). El método, denominado de forma resumida "un proceso de dos etapas", comprende la producción fermentativa de un precursor de L-metionina y la conversión enzimática del precursor de L-metionina en L-metionina. El precursor de metionina preferentemente incluye O-acetilhomoserina y O-succinil homoserina. El proceso de dos etapas es evaluado en términos de haber superado los problemas de los que adolecen los métodos convencionales, tales como toxicidad de sulfuro, regulación de retroalimentación en la síntesis de metionina mediante metionina y SAMe, y degradación de intermedios mediante cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa y O-acetilhomoserina sulfhidrilasa. Además, en comparación con el método de síntesis química convencional de producción de DL-metionina, el proceso de dos etapas tiene la ventaja de ser selectivo para L-metionina solamente, con la producción concomitante de ácidos orgánicos, tales como ácido succínico y ácido acético como subproductos útiles.

Descubierta como intermedio en la ruta de biosíntesis de metionina, la O-acetil-homoserina se usa como precursor para la producción de metionina (WO 2008/013432). La O-acetil-homoserina se sintetiza a partir de L-homoserina y acetil-CoA con ayuda de O-acetil transferasa, tal como se muestra en la siguiente fórmula:

35



En la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 12/062835 del cesionario de la presente invención, se desvela una cepa de microorganismo en la que se introduce un gen *thrA* responsable de la actividad aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa y un gen *metX* derivado de *Deinococcus* que codifica homoserina acetil transferasa, para mejorar la biosíntesis de L-homoserina y O-acetil-homoserina, respectivamente, y un método para producir O-acetil homoserina con alto rendimiento usando dicha cepa.

En este contexto, los inventores de la presente invención concibieron que la intensificación de las otras tres enzimas responsables de las reacciones catalíticas en la ruta de biosíntesis de homoserina, es decir, fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), aspartato aminotransferasa (*aspC*) y aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), incrementaría un rendimiento de producción de O-acetil homoserina mayor que el método del documento US12/062835.

Como la intensificación concomitante de una serie de las enzimas implicadas en la conversión de fosfoenolpiruvato en O-acetilhomoserina de acuerdo con la presente invención, se han realizado intentos de incrementar la productividad de L-aminoácidos expresando simultáneamente las enzimas que desempeñan papeles importantes en las rutas de biosíntesis de L-aminoácidos derivados de aspartato, tales como L-lisina, L-treonina y L-metionina.

El documento EP00900872 se refiere a la producción eficaz de L-lisina, que presenta un incremento de las actividades de una serie de enzimas implicadas en la biosíntesis de lisina, incluyendo dihidropicolinato sintasa (*dapA*), aspartoquinasa (*lysC*), dihidropicolinato reductasa (*dapB*), diaminopimelato deshidrogenasa (*ddh*), tetrahidropicolinato succinilasa (*dapD*), succinil diaminopimelato diacilasa (*lysE*), aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), en *E. coli*. Las patentes japonesas N.º JP2006-520460 y JP2000-244921 describen la producción eficaz de L-treonina en *E. coli* incrementando las actividades de aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), aspartoquinasa (*thrA*), homoserina deshidrogenasa (*thrA*), homoserina quinasa (*thrB*) y treonina sintasa (*thrC*). Además, el documento WO 2007/012078 desvela una cepa recombinante de *Corynebacterium* capaz de producir niveles incrementados de L-metionina en la que genes que codifican aspartoquinasa (*lysC*), homoserina deshidrogenasa (*hom*), homoserina acetil transferasa (*metX*), O-acetilhomoserina sulfhidrilasa (*metY*), cistationina gamma sintasa (*metB*), transmetilasa dependiente de cobalamina (*metH*), metionina sintasa independiente de cobalamina (*metE*), metiltetrahidrofolato

65

reductasa (metF), y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (zwf) tienen el nivel de expresión incrementado, mientras que genes que codifican proteína represora de metionina (mcbR), homoserina quinasa (hsk), S-adenosilmetionina sintetasa (metK), y treonina deshidratasa (livA) tienen el nivel de expresión reducido.

5 Todas las patentes están relacionadas con la producción eficaz de L-aminoácidos derivados de aspartato, es decir, L-lisina, L-treonina y L-metionina, respectivamente, que presenta el empleo de combinaciones de genes que dependen de los productos respectivos.

10 El documento WO2006/082252 se refiere a una cepa de *Escherichia* para producir alfa-cetobutirato a través de una reacción de gamma-eliminación de OAH. El documento WO 2007/012078 se refiere a un microorganismo recombinante con productividad de metionina intensificada.

15 En la presente invención, están diseñadas una serie de enzimas responsables de las etapas catalíticas desde fosfoenolpiruvato a O-acetilhomoserina en la ruta de biosíntesis de O-acetilhomoserina, para incrementar su nivel de expresión para producir O-acetilhomoserina con mayor rendimiento, lo que no se ha mencionado nunca en la documentación anterior. Además, la combinación de enzimas empleada en la presente invención es diferente de la empleada para la producción del L-aminoácido derivado de aspartato, tal como L-lisina, L-treonina o L-metionina, como productos finales, son diferentes.

20 Conduciendo a la presente invención, una investigación intensiva y exhaustiva sobre la producción de O-acetil homoserina con máximo rendimiento, llevada a cabo por los inventores de la presente invención, dio como resultado el descubrimiento de que la intensificación concomitante de los genes que codifican aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa (thrA), y homoserina acetil transferasa (metX) más un gen que codifica al menos una enzima  
25 seleccionada entre fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc), aspartato aminotransferasa (aspC) y aspartato semialdehído deshidrogenasa (asd) en forma de un ADN genómico y/o un plásmido en una cepa de microorganismo podría provocar un incremento significativo de la producción de O-acetil homoserina.

#### Sumario de la invención

30 Es, por lo tanto, un objetivo de la presente invención proporcionar una cepa de microorganismo capaz de producir O-acetil homoserina con alto rendimiento, que está diseñada para fortificar una serie de genes responsables de las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de homoserina desde fosfoenolpiruvato a O-acetil homoserina.

35 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un método de producción de O-acetil homoserina con alto rendimiento, usando la cepa de microorganismo.

40 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una cepa de *Escherichia* sp., capaz de producir O-acetil homoserina con alto rendimiento, con sobreexpresión de genes que codifican homoserina acetil transferasa, aspartoquinasa, homoserina deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa y aspartato semialdehído deshidrogenasa, en la que la cepa de *Escherichia* sp., se caracteriza además por la delección de genes *metB*, *thrB*, *metJ* y *metA*.

45 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de producción de O-acetil homoserina en un medio de cultivo, que comprende fermentar la cepa en el medio de cultivo.

50 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de producción de L-metionina y acetato, que comprende: (a) fermentar la cepa para producir O-acetil homoserina; (b) separar la O-acetil homoserina; y (c) convertir la O-acetil homoserina, junto con metilmercaptano, en L-metionina y acetato en presencia de una enzima seleccionada entre un grupo que consiste en cistationina gamma sintasa, O-acetil homoserina sulfhidrilasa y O-succinil homoserina sulfhidrilasa.

55 De acuerdo con la presente invención, por lo tanto, puede producirse O-acetil homoserina con alto rendimiento fermentando una cepa de *Escherichia* sp., que ancla los seis genes de aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa (thrA), homoserina acetil transferasa (metX), fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc), aspartato aminotransferasa (aspC) y aspartato semialdehído deshidrogenasa (asd), responsables de la ruta de biosíntesis desde fosfoenolpiruvato a O-acetil homoserina, en forma de ADN cromosómico o ADN plasmídico. Además, la O-acetil-L-homoserina producida por la cepa de la presente invención puede convertirse, tal como se desvela en el documento WO2008/013432, titulado "Microorganism producing L-methionine precursor and method of producing L-methionine and organic acid from the L-methionine precursor", expedida a los inventores de la presente invención,  
60 en L-metionina con alto rendimiento.

La materia para la que se busca protección es tal como se expone en las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

Los anteriores y otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

- 5 La figura 1 es una vista esquemática que muestra una ruta de biosíntesis de O-acetil homoserina de la cepa de acuerdo con la presente invención;  
 La figura 2 es una vista esquemática que muestra el mapa genético y la construcción de un vector pSG-2ppc para integración cromosómica;  
 10 La figura 3 es una vista esquemática que muestra el mapa genético y la construcción de un vector pSG-2aspC para integración cromosómica;  
 La figura 4 es una vista esquemática que muestra el mapa genético y la construcción de un vector pSG-2asd para integración cromosómica; y  
 15 La figura 5 es una vista esquemática que muestra el mapa genético y la construcción de un vector de expresión pCJ-thrA(M)-metX-CL;

**Descripción de las realizaciones preferidas**

20 De acuerdo con un aspecto de la misma, la presente invención se refiere a una cepa de *Escherichia* sp., capaz de producir O-acetil homoserina con alto rendimiento, con sobreexpresión de genes que codifican homoserina acetil transferasa, aspartoquinasa, homoserina deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa y aspartato semialdehído deshidrogenasa, en la que la cepa de *Escherichia* sp., se caracteriza además por la delección de genes *metB*, *thrB*, *metJ* y *metA*.

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “precursor de L-metionina” pretende referirse a un metabolito descubierto en la ruta de biosíntesis de metionina o un derivado de la misma, y particularmente a O-acetil homoserina.

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “cepa que produce O-acetil homoserina” pretende referirse a un microorganismo eucariota o procariota que puede producir O-acetil homoserina por vía intracelular o extracelular y particularmente a un microorganismo modificado genéticamente que puede acumular O-acetil homoserina en su interior. Los ejemplos de la cepa útiles en la presente invención incluyen *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacteria* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Salmonella* sp., *Brevibacteria* sp., *Hypomononas* sp., *Chromobacterium* sp., *Nocardia* sp., hongos y levaduras, con preferencia por *Escherichia* sp., *Corynebacteria* sp., y *Leptospira* sp., y levaduras. Más preferida es *Escherichia* sp. Mucho más preferida es *Escherichia coli*. Aún mucho más preferida es una cepa de *E. coli* que puede producir L-lisina, L-treonina, L-isoleucina o L-metionina. Lo más preferido es un derivado de la cepa de *E. coli* de N.º de acceso del KCCM (*Korean Culture Center of Microorganisms*) 10921P o KCCM 10925P depositada por el cesionario de la presente invención (US12/062835), o de FTR2533 (N.º de acceso KCCM 10541).

40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “introducción e intensificación de actividad” pretende significar un incremento de la actividad intracelular de una enzima codificada por el gen correspondiente, que puede conseguirse, generalmente, mediante la sobreexpresión del gen. Existen muchas estrategias para la sobreexpresión de un gen diana. Por ejemplo, la sobreexpresión puede implementarse mediante la modificación de una base en la región promotora y/o 5'-UTR para el gen diana, introduciendo la copia extra del gen diana en el cromosoma, o mediante la introducción del gen diana en combinación con un promotor autólogo o uno heterólogo sobre un vector, seguido por la transformación del vector en una cepa de microorganismo. Además, una mutación en el ORF (marco abierto de lectura) del gen diana puede dar como resultado la sobreexpresión del mismo. En términos numéricos, cuando se produce sobreexpresión, la proteína correspondiente incrementa su actividad o concentración en un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, 1000 % o hasta 2000 %, en comparación con cuando se expresa en un estado natural. Las estrategias para la introducción e intensificación de la actividad de un gen incluyen transformación con un plásmido que porta el gen correspondiente, un incremento del número de copias de genes, el empleo de un promotor fuerte para el gen, o una mutación en un promotor preexistente para el gen.

55 En una realización preferida de la misma, la presente invención proporciona una cepa de microorganismo capaz de producir O-acetil homoserina con mayor rendimiento, con la introducción e intensificación de la actividad de una serie de seis enzimas que consisten en aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa (*thrA*), homoserina acetil transferasa (*metX*), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), aspartato aminotransferasa (*aspC*), y aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), y un método de producción de O-acetil homoserina usándola. Preferentemente, aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa (*thrA*) u homoserina acetil transferasa (*metX*) se introducen en y se intensifican en células mediante transformación con un vector de expresión que porta los genes correspondientes mientras que dos o más copias de un gen que codifica al menos una seleccionada entre fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), aspartato aminotransferasa (*aspC*) y aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*) pueden estar ubicadas en el genoma de la cepa de microorganismo. De la forma más preferente, todos estos tres genes están ubicados en dos o más copias en el genoma de *E. coli*.

Con mayor detalle, la cepa de microorganismo está diseñada para incrementar el nivel del gen *metX* que codifica homoserina O-acetiltransferasa responsable de la primera etapa de la ruta de biosíntesis de metionina, que causa una mejora de la síntesis del precursor de L-metionina O-acetil homoserina. En el presente documento, *metX* se refiere, en general, a un gen que codifica una proteína que tiene la actividad de homoserina, O-acetiltransferasa.

5 Para uso en la presente invención, nueva, homoserina O-acetiltransferasa exógena puede originarse a partir de diversos microorganismos. Los ejemplos de los microorganismos a partir de los que puede obtenerse un gen que codifica homoserina O-acetiltransferasa, incluyen *Corynebacterium sp.*, *Leptospira sp.*, *Deinococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, o *Mycobacterium sp.*, aunque no se limitan a estos. Preferentemente, la homoserina O-acetiltransferasa puede estar codificada por un gen que se origina a partir de una cepa seleccionada entre un grupo

10 que consiste en *Corynebacterium glutamicum*, *Leptospira meyeri*, *Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium smegmatis*. Más preferentemente, la homoserina O-acetiltransferasa tiene una secuencia de aminoácidos de la base de datos UniProt N.º de acceso Q9RVZ8 (SEQ ID NO. 18), NP\_249081 (SEQ ID NO. 19) o YP\_886028 (SEQ ID NO. 20). Se sabe que el gen *metX* que se origina a partir de *Leptospira meyeri* muestra resistencia a la inhibición por retroalimentación (J Bacteriol. Enero de 1998; 180(2): 250-5. Belfaiza J *et al.*).

15 También se descubrió que las otras homoserina O-acetiltransferasas eran refractarias a inhibición por retroalimentación en estudios previos de los inventores de la presente invención.

Por ejemplo, la introducción e intensificación de homoserina O-acetiltransferasa puede implementarse mediante la introducción de *metX* o mediante la modificación de una base en la región 5'-UTR y/o promotora para el gen diana.

20 Preferentemente, el gen diana en combinación con un promotor autólogo o heterólogo se inserta en un vector, seguido por la transformación del vector en una cepa de microorganismo. La introducción e intensificación de *metX* da como resultado un incremento de la síntesis del precursor de metionina.

Además, la cepa de microorganismo está diseñada para incrementar la actividad de aspartoquinasa u homoserina deshidrogenasa para mejorar la síntesis del precursor de O-acetil homoserina, homoserina. En el presente documento, *thrA* se refiere, en general, a un gen que codifica un péptido que tiene la actividad de aspartoquinasa y homoserina deshidrogenasa. Preferentemente, la aspartoquinasa y homoserina deshidrogenasa es codificada por un gen de la base de datos Uniprot N.º de acceso AP\_000666. El gen *thrA* puede introducirse preferentemente mediante un plásmido y permanecer como un ADN plasmídico. Es decir, un vector de expresión que porta el gen

25 *thrA* puede transformarse en la cepa. Más preferentemente, tanto *metX* como *thrA* se introducen en la cepa y permanecen como ADN plasmídicos en la cepa. Es decir, un vector de expresión que porta tanto *metX* como *thrA* se transforma en la cepa.

En una realización de la presente invención, la cepa de microorganismo que produce O-acetil-L-homoserina puede prepararse de la siguiente manera.

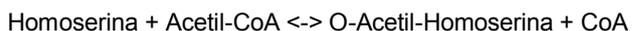
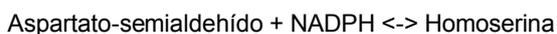
35

En primer lugar, la cepa de microorganismo está diseñada para acumular O-acetil-L-homoserina incrementando el número de copias de genes que codifican respectivamente fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), aspartato aminotransferasa (*aspC*) y aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*). Para esto, estos genes se clonan en

40 vectores pSG respectivos útiles para la integración de un gen en un cromosoma, seguida por transformación con los vectores pSG para incrementar el número de los genes respectivos a dos o más copias. Como resultado, la expresión de los genes mejora. A continuación, los genes que codifican aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa (*thrA*) y homoserina acetil transferasa (*metX*) se introducen como ADN plasmídicos en la cepa de microorganismo. A este respecto, un operón *thrA-metX* compuesto por un gen *thrA* (aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa), un gen *metX* (homoserina acetil transferasa) derivado de *Deinococcus*, y un promotor CJ1 se construye y se clona en pCL1920, un plásmido de bajas copias, seguido por la transformación del plásmido recombinante en la cepa que tiene 2 copias de cada uno de los genes (fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), aspartato aminotransferasa (*aspC*) y aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*)). Por lo tanto, la cepa de microorganismo mejora en cada etapa de la ruta de biosíntesis desde fosfoenolpiruvato a O-acetil homoserina.

50

Una serie de las enzimas son responsables de las etapas catalíticas de la ruta de biosíntesis desde fosfoenolpiruvato a O-acetil homoserina tal como se muestra en las siguientes fórmulas de reacción. Por consiguiente, la sobreexpresión de los genes en serie causa la acumulación intracelular de O-acetil homoserina.



Genes que codifican respectivamente fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa, aspartato semialdehído deshidrogenasa, aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa, y homoserina acetil transferasa se expresan, generalmente, como *ppc*, *aspC*, *asd*, *thrA* y *metX*. Estos genes pueden obtenerse de las secuencias genómicas de *Escherichia coli* y *Deinococcus radiodurans* R1 desveladas previamente (Mol Syst Biol. 2006; 2: 2006.0007. Publicación en línea, 21 de febrero de 2006., Science. 19 de noviembre de 1999; 286(5444): 1571-7). Además, las secuencias génicas pueden obtenerse de bases de datos públicas tales como las construidas por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) o el DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Por ejemplo, el N.º de ID. del GenBank 89110074 se da a *ppc*, el N.º de ID. del GenBank 85674274 a *aspC*, el N.º de ID. del GenBank 89110578 a *asd*, el N.º de ID. del GenBank 89106886 a *thrA*, y el N.º de ID. del GenBank 1799718 a *metX*. La cepa de microorganismo preparada de este modo se mejora en una serie de etapas catalíticas que se prolongan desde aspartato a O-acetil homoserina en la ruta de biosíntesis, produciendo de este modo O-acetil-L-homoserina con alto rendimiento. Esta cepa que produce O-acetil homoserina, CJM-XPA2 (pCJ-thrA(M)-metX-CL), llamada “*Escherichia coli* CA05-0567” se depositó en la KCCM (*Korean Culture of Microorganisms*, Eulim build, Hongje-1-Dong, Seodaemun-ku, Seúl, 361-221, Corea) el 11 de agosto de 2009, con el N.º de acceso KCCM11025P.

Una cepa que produce L-metionina puede prepararse basándose en una cepa que produce L-lisina-, L-treonina-, o L-isoleucina, y preferentemente basándose en una cepa que produce L-treonina. En este caso, estas cepas ya han sido adaptadas para sintetizar homoserina y pueden genomanipularse adicionalmente para producir el precursor de metionina en una gran cantidad incrementando la expresión de *metX*.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “cepa que produce L-treonina” pretende referirse a un microorganismo procarionta o eucarionta que puede producir L-treonina de forma intracelular. Los ejemplos de la cepa útil en la presente invención incluyen *Escherichia sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Providencia sp.*, *Corynebacteria sp.*, *Pseudomonas sp.*, o *Brevibacteria sp.*, con preferencia por *Escherichia sp.* Más preferida es *Escherichia coli*.

En una realización preferida de la presente invención, puede usarse la cepa que produce L-treonina FRT2533 desvelada en el documento WO 2005/075625. FTR2533 se deriva de *Escherichia coli* TFR7624 que se origina a partir de la *Escherichia coli* N.º de acceso KCCM10236 que se basa, a su vez, en *Escherichia coli* TF4076. *Escherichia coli* N.º de acceso KCCM10236 expresa a niveles altos el gen *ppc* que codifica una enzima responsable de la formación de oxaloacetato a partir de PEP, junto con los genes que codifican enzimas esenciales para la biosíntesis de treonina a partir de aspartato, incluyendo *thrA* (aspartoquinasa, 1-homoserina deshidrogenasa), *thrB* (homoserina quinasa), y *thrC* (treonina sintasa), mostrando de este modo productividad incrementada de L-treonina. *Escherichia coli* TFR7624 (KCCM10538) porta un gen *tyrR* inactivado que reprime la expresión del gen *tyrB* necesario para la biosíntesis de L-treonina. *Escherichia coli* FTR2533 (KCCM10541) es una cepa de *E.coli* que produce L-treonina que porta un gen *galR* inactivado.

En una realización preferida de la presente invención, puede usarse CJM2-X/pthrA(M)-CL (N.º de acceso KCCM 10925P), desvelada en el documento US 12/062835. Esta cepa se deriva de *E. coli* FTR2533 delecionando los genes *metB*, *thrB*, *metJ* y *metA* e insertando un gen *metX* derivado de *Deinococcus radiodurans* en el locus de *metA*, seguido por transformación con un vector de expresión que porta un gen *thrA*.

Además, en una realización preferida de la presente invención, puede usarse CJM-X/pthrA(M)-CL (N.º de acceso KCCM 10921P), desvelada en el documento US 12/062835. Esta cepa se deriva de *E.coli* CJM002 (N.º de acceso KCCM10568) delecionando los genes *metB*, *thrB*, *metJ* y *metA* e insertando un gen *metX* derivado de *Deinococcus radiodurans* en el locus de *metA*, seguido por transformación con un vector de expresión que porta un gen *thrA*.

En ejemplos concretos de la presente invención, dos copias de cada uno de los genes *ppc*, *aspC* y *asd* se integran en el cromosoma de *E. coli*. Con este fin, se construyen plásmidos recombinantes para la integración de genes respectivos, tal como se muestra en la figura 2 para pSG-2ppc, la figura 3 para pSG-2aspC, y la figura 4 para pSG-2asd. Además, un vector de expresión recombinante pCJ-thrA(M)-metX-CL se construye para expresar tanto *thrA* como *metX* simultáneamente (figura 5). Los vectores recombinantes pSG-2ppc, pSG-2aspC y pSG-2asd se transforman secuencialmente en la cepa CJM-X/pthrA(M)-CL intensificada con los genes *thrA* y *metX*, desvelada en el documento US 12/062835 (N.º de acceso KCCM 10921P). La cepa transformada tiene dos copias de cada uno de los genes *ppc*, *aspC* y *asd* integradas en el cromosoma de la misma y se llama CJM-XPA2. Después de la transformación con el vector pCJ-thrA(M)-metX-CL, esta cepa mutante se cultiva en matraces para analizar cuantitativamente la producción de O-acetil homoserina. En comparación con el control CJM-X/pthrA(M)-CL (N.º de acceso KCCM 10921P), se descubrió que el rendimiento de producción de O-acetil se incrementaba en un 3,6 % del 29,1 % al 32,7 % en la cepa que tenía dos copias de cada uno de los genes *ppc*, *aspC*, *asd* (responsables de la conversión de fosfoenolpiruvato en aspartato) integradas en el cromosoma de la misma, y en hasta un 16,9 % del 29,1 % al 46 % en la cepa que anclaba todos los genes *ppc*, *aspC*, *asd*, *thrA* y *metX* (responsables de la ruta de biosíntesis desde fosfoenolpiruvato a O-acetil homoserina) en forma de ADN cromosómico o ADN plasmídico. Considerando el hecho de que el rendimiento de producción de O-acetil homoserina era del 32,7 % tras la intensificación de solamente los genes *ppc*, *aspC* y *asd* (responsables de la conversión de fosfoenolpiruvato en aspartato) y del 37,5 % tras la intensificación de solamente *thrA* y *metX*, cuando todos los genes responsables de toda la ruta de biosíntesis que se extiende desde fosfoenolpiruvato a O-acetil homoserina se intensifican juntos, el rendimiento de producción de O-acetil homoserina se incrementa adicionalmente al 46 % (ejemplo 2, tabla 2). Por lo

tanto, la cepa preparada de acuerdo con la presente invención produce O-acetil homoserina en mayor rendimiento que la contrapartida de tipo silvestre.

5 De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención se refiere a un método de producción de O-acetil-homoserina, que comprende la fermentación de la cepa de *E. coli* que produce O-acetil-homoserina en un medio de cultivo para acumular O-acetil-homoserina en el medio.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención se refiere a un método de producción de L-metionina y acetato, que comprende (a) producir O-acetil-homoserina mediante la fermentación de la cepa de *Escherichia sp.*, que produce O-acetil homoserina de la presente invención; (b) separar la O-acetil homoserina; y (c) convertir la O-acetilhomoserina separada, junto con metilmercaptano, en L-metionina y acetato en presencia de una transferasa seleccionada entre cistationina gamma sintasa, O-acetilhomoserina sulfhidrilasa y O-succinilhomoserina sulfhidrilasa.

15 Cuando se usa en conexión con la cepa de la presente invención, el método de producción de L-metionina, que se basa en el uso de la enzima convertidora, cistationina gamma sintasa, O-acetilhomoserina sulfhidrilasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa, tal como se desvela en el documento WO 2008/013432, expedido a los inventores de la presente invención, puede provocar un mayor rendimiento en la producción de L-metionina.

20 La cepa que produce O-acetil-L-homoserina preparada anteriormente puede cultivarse en un medio y en condiciones conocidos en la técnica. Como es bien entendido por los expertos en la materia, el método de cultivo puede ajustarse de acuerdo con la cepa usada. La fermentación puede llevarse a cabo en un lote, en un cultivo de tipo continuo o en uno semicontinuo, aunque no se limita a esto. En la siguiente referencia: "Biochemical Engineering" de James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, págs. 138-176, se describen diversos métodos de fermentación.

25 El medio de cultivo tiene que cumplir las condiciones de cultivo para una cepa específica. Diversos medios de cultivo de microorganismos se describen en la siguiente referencia: "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology, Washington D. C., EE. UU., 1981. En general, un medio de cultivo incluye diversas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y oligoelementos. Los ejemplos de la fuente de carbono incluyen carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y 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. Estas fuentes de carbono pueden usarse en solitario o en combinación. Los ejemplos de la fuente de nitrógeno incluyen fuentes de nitrógeno orgánicas, tales como peptona, extracto de levadura, salsa de carne, extracto de malta, licor de maíz fermentado (CSL) y harina de alubias, y fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio, que pueden usarse en solitario o en combinación. Adicionalmente, el medio puede contener dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio y/o las sales que contienen sodio, correspondientes de los mismos. Además, en el medio puede haber metal en forma de sales, como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, también pueden añadirse aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Los medios o los precursores pueden añadirse al cultivo de forma discontinua o continua.

45 El pH del cultivo puede ajustarse con un compuesto adecuado, por ejemplo, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido de fosfato, y ácido sulfúrico. Con el fin de inhibir la generación de burbujas en el cultivo, puede usarse un agente desespumante tal como éster poliglicólico de ácidos grasos. Para crear condiciones aeróbicas, el medio de cultivo puede airearse con oxígeno o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire). El medio de cultivo se mantiene a 20 ~ 45 °C y preferentemente a 25 ~ 90 °C. La cepa se cultiva a un nivel deseado del precursor de L-metionina preferentemente durante 10 ~ 160 h.

50 Una mejor comprensión de la presente invención puede obtenerse a través de los siguientes ejemplos que se describen para ilustrar, pero no debe interpretarse que limitan la presente invención.

#### **EJEMPLO 1: Preparación de la cepa que produce O-acetil homoserina**

55 <1-1> Construcción del vector pSG, para integración cromosómica de *ppc*

Para el uso en la integración de *ppc* en el cromosoma de *E. coli*, se construyó un vector pSG-2*ppc*.

60 La secuencia básica del gen *ppc* se obtuvo de la base de datos GenBank del NIH (NCBI-gi: 89110074). Tomando como base esta secuencia básica, se sintetizaron dos conjuntos de cebadores para la amplificación del gen *ppc*: un conjunto que comienza desde 200 pb cadena arriba del codón de inicio del ORF de *ppc* y que contiene los sitios de las enzimas de restricción EcoRI y SacI (SEQ ID NO. 1 y 2); y el otro conjunto que comienza desde 200 pb cadena arriba del codón de inicio del ORF de *ppc* y que contiene los sitios de las enzimas de restricción SacI y KpnI (SEQ ID NO. 3 y 4). Aunque el ADN cromosómico de *Escherichia coli* W3110 sirvió como plantilla, se realizó PCR usando un conjunto de cebadores de SEQ ID NO. 1 y 2 o SEQ ID NO. 3 y 4 en presencia de ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra™ (Stratagene), con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s; hibridación a 50 °C durante 30 s; y

## ES 2 606 540 T3

extensión a 72 °C durante 4 min.

Los productos de PCR obtenidos de este modo fueron dos tipos de genes *ppc* de aproximadamente 3,1 kb que contenían sitios de EcoRI y SacI, y sitios de SacI y KpnI en su interior, respectivamente.

Después de la digestión con las enzimas de restricción EcoRI y SacI, y SacI y KpnI, respectivamente, los dos genes *ppc* amplificados se ligaron entre sí y se insertaron en un vector pSG76-C tratado con enzimas de restricción EcoRI y KpnI (J Bacteriol. Julio de 1997; 179(13): 4426-8), para construir un plásmido recombinante pSG-2ppc que porta dos copias del gen *ppc*. La figura 2 muestra el mapa genético y la construcción del vector pSG-2ppc para integración cromosómica de 2 copias de *ppc*.

<1-2> Construcción del vector pSG para integración cromosómica de *aspC*

Para uso en la integración de *aspC* en el cromosoma de *E. coli*, se construyó un vector pSG-2aspC.

La secuencia básica del gen *aspC* se obtuvo de la base de datos GenBank del NIH (NCBI-gi: 85674274). Tomando como base esta secuencia básica, se diseñó un conjunto de cebadores para la amplificación del gen *aspC* para comenzar desde 200 pb cadena arriba del codón de inicio del ORF de *aspC* y contener el sitio de la enzima de restricción BamHI (SEQ ID NO. 5 y 6).

Aunque el ADN cromosómico de *Escherichia coli* W3110 sirvió como plantilla, se realizó PCR usando un conjunto de cebadores de SEQ ID NO. 5 y 6 en presencia de ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra™ (Stratagene), con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s; hibridación a 50 °C durante 30 s; y extensión a 72 °C durante 2 min.

El producto de PCR obtenido de este modo fue un gen *aspC* de aproximadamente 1,5 kb que contenía un sitio de BamHI en su interior.

Después de la digestión con la enzima de restricción BamHI, el gen *apsC* amplificado se ligó a un vector pSG76-C tratado con la misma enzima de restricción para construir un plásmido recombinante pSG-2aspC que porta dos copias del gen *aspC*. La figura 3 muestra el mapa genético y la construcción del vector pSG-2aspC para integración cromosómica de 2 copias de *aspC*.

<1-3> Construcción del vector pSG para integración cromosómica de *asd*

Para uso en la integración de *asd* en el cromosoma de *E. coli*, se construyó un vector pSG-2asd.

La secuencia básica del gen *asd* se obtuvo de la base de datos GenBank del NIH (NCBI-gi: 89110578). Tomando como base esta secuencia básica, se sintetizaron dos conjuntos de cebadores para la amplificación del gen *asd*: un conjunto que comienza desde 200 pb cadena arriba del codón de inicio del ORF de *asd* y que contiene los sitios de las enzimas de restricción EcoRI y XbaI (SEQ ID NO. 7 y 8); y el otro conjunto que comienza desde 200 pb cadena arriba del codón de inicio del ORF de *asd* y que contiene los sitios de las enzimas de restricción XbaI y EcoRI (SEQ ID NO. 9 y 10).

Aunque el ADN cromosómico de *Escherichia coli* W3110 sirvió como plantilla, se realizó PCR usando un conjunto de cebadores de SEQ ID NO. 7 y 8 o SEQ ID NO. 9 y 10 en presencia de ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra™ (Stratagene), con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s; hibridación a 50 °C durante 30 s; y extensión a 72 °C durante 2 min.

Los productos de PCR obtenidos de este modo fueron dos clases de genes *asd* de aproximadamente 1,5 kb que contenían sitios EcoRI y XbaI, y sitios XbaI y EcoRI en su interior, respectivamente.

Después de la digestión con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI, los genes *asd* amplificados se ligaron entre sí y se insertaron en un vector pSG76-C tratado con la enzima de restricción EcoRI para construir un plásmido recombinante pSG-2asd que porta dos copias del gen *asd*. La figura 4 muestra el mapa genético y la construcción del vector pSG-2asd para integración cromosómica de 2 copias de *asd*.

<1-4> Construcción de pCJ-thrA(M)-metX-CL recombinante para la expresión de *ThrA* y *MetX*

Para la biosíntesis de O-acetil homoserina, se intensificaron *thrA* y *metX* mediante la introducción de un vector de expresión recombinante que porta los genes.

Una secuencia de nucleótidos del gen *metX* se obtuvo del GenBank del NIH (NCBI gi: 1799718). Tomando como base esta secuencia de nucleótidos, se diseñó un conjunto de cebadores para cubrir un ORF de *metX* que varía entre ATG y TAA y tienen el sitio de la enzima de restricción HindIII en ambos extremos del mismo (SEQ ID NO. 11 y 12).

Usando los cebadores de las SEQ ID NO. 11 y 12, se realizó PCR en presencia de ADN polimerasa de alta fidelidad con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s; hibridación a 50 °C durante 30 s; y extensión a 72 °C durante 2 min durante la cual el ADN cromosómico de *Deinococcus radiodurans* R1 servía como plantilla.

- 5 El producto de PCR obtenido de este modo era un gen *metX* de aproximadamente 1 kb que contenía el sitio de la enzima de restricción HindIII.

Después de la digestión con la enzima de restricción HindIII, el gen *metX* amplificado se ligó al vector de expresión de *thrA*, plásmido pCJ-*thrA*(M)-CL, desvelado en el documento US12/062835, que se trató previamente con la misma enzima de restricción, para construir un vector de expresión recombinante que porta tanto *thrA* como *metX*, denominado pCJ-*thrA*(M)-*metX*-CL (figura 5).

<1-5> Preparación de una cepa que produce O-acetil-homoserina

15 El plásmido pSG-2ppc que porta dos copias del gen *ppc*, construido en el ejemplo <1-1>, se transformó en la cepa desvelada en el documento US12/062835, CJM-X/*pthrA*(M)-CL (N.º de acceso KCCM 10921P), seguido por incubación en placas LB-Cm (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, cloranfenicol 25 µg/l) para seleccionar 10 colonias resistentes a cloranfenicol para cada transformante. El transformante seleccionado anclaba el vector pSG-2ppc en el sitio de *ppc* cromosómico del mismo. A continuación, la cepa con dos copias del gen *ppc* insertada en su interior se transformó con pAScep, un vector de expresión que porta la enzima de restricción I-SceI, para escindir el sitio de I-SceI presente en el vector pSG, seguido por la selección en LB-Ap (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, Triptona 10 g/l, Ampicilina 100 µg/l). Como resultado, se seleccionó una cepa en la que 2 copias del gen *ppc* se anclaron en el cromosoma de la misma, con el vector pSG76-C eliminado de la misma. El mismo procedimiento que en el plásmido pSG-2ppc se repitió para los vectores pSG76C-2aspC y pSG76C-2asd, construidos en los ejemplos <1-2> y <1-3>, respectivamente, en orden. Finalmente, se obtuvo una cepa de CJM-X/*pthrA*(M)-CL (N.º de acceso 10921P) con dos copias de cada uno de *ppc*, *asd* y *aspC* insertadas en el cromosoma de la misma, y se llamó CJM-XPA2.

Además, la cepa CJM-XPA2 se transformó con el vector pCJ-*thrA*(M)-*metX*-CL construido en el ejemplo <1-4> y a continuación se cultivó en LB-Sp (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, Triptona 10 g/l, espectinomicina 25 µg/l) para seleccionar 10 colonias resistentes a espectinomicina. La CJM-XPA2 (pCJ-*thrA*(M)-*metX*-CL), llamada "*Escherichia coli* CA05-0567" se depositó en la KCCM (*Korean Culture of Microorganisms*, Eulim build, Hongje-1-Dong, Seodaemun-ku, Seúl, 361-221, Corea) el 11 de agosto de 2009, con el N.º de acceso KCCM11025P. Se compararon entre sí para productividad de O-acetil homoserina.

### **EJEMPLO 2: Fermentación para la producción de O-acetil homoserina**

Con el fin de examinar las cepas preparadas en el ejemplo 1 para la capacidad de producir el precursor de metionina, O-acetil homoserina, éstas se cultivaron en matraces Erlenmeyer.

Para este cultivo, se empleó el medio de valoración cuantitativa de O-acetil-homoserina mostrado en la tabla 1.

TABLA 1

Composición del medio para la producción de O-acetil-homoserina	
Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	60 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
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	5 mg
MnSO <sub>4</sub> • 8H <sub>2</sub> O	5 mg
ZnSO <sub>4</sub>	5 mg
CaCO <sub>3</sub>	30 g
Extracto d levadura	2 g
Metionina	0,15 g
Treonina	0,15 g

45 Se generaron colonias individuales en placas de LB durante la incubación durante una noche a 32 °C, se recogieron con asas de platino y se inocularon respectivamente en 25 ml del medio de valoración cuantitativa de O-acetil homoserina, seguido por cultivo a 32 °C durante 42 ~ 64 h con agitación a 250 rpm. Cada cultivo se analizó cuantitativamente para O-acetil homoserina usando HPLC. Los datos del análisis se resumen en la tabla 2, a

continuación.

- 5 En comparación con la CJM-X/pthrA(M)-CL de control (N.º de acceso KCCM 10921P), tal como se muestra en la tabla 2, se descubrió que el rendimiento de producción de O-acetil homoserina se incrementaba en un 3,6 % del 29,1 % al 32,7 % en la cepa que tiene dos copias de cada uno de los genes *ppc*, *aspC*, *asd*, responsables de la conversión de fosfoenolpiruvato en aspartato, integradas en el cromosoma de la misma, y en hasta un 16,9 % del 29,1 % al 46 % en la cepa que ancla todos los genes *ppc*, *aspC*, *asd*, *thrA* y *metX*, responsables de la ruta de biosíntesis desde fosfoenolpiruvato a O-acetil homoserina, en forma de ADN cromosómico o ADN plasmídico.
- 10 Tomados conjuntamente, los datos obtenidos en los ensayos en matraz indican que, considerando el hecho de que el rendimiento de producción de O-acetil homoserina es del 32,7 % tras la intensificación de solamente los genes *ppc*, *aspC* y *asd*, responsables de la conversión de fosfoenolpiruvato en aspartato, y el 37,5 % tras la intensificación de solamente *thrA* y *metX*, cuando todos los genes responsables de toda la ruta de biosíntesis que se extiende desde fosfoenolpiruvato a O-acetil homoserina se intensifican juntos, el rendimiento de producción de O-acetil homoserina se incrementa adicionalmente hasta el 46 %. Por lo tanto, la cepa preparada de acuerdo con la presente invención producía O-acetil homoserina con mayor rendimiento que la contrapartida de tipo silvestre.
- 15

TABLA 2

Ensayos en matraz para la producción de O-acetil-homoserina			
Cepa	Plásmido	Producción de OAH (g/l)	Rendimiento (%)
CJM-X/pthrA(M)-CL (N.º de acceso KCCM 10921P)	-	17,5	29,1
	pCJ-thrA(M)-metX-CL	22,5	37,5
CJM-XPA2	-	19,6	32,7
	pCJ-thrA(M)-metX-CL	27,6	46,0

20 **Aplicabilidad industrial**

Tal como se ha descrito hasta ahora, la presente invención proporciona una cepa de *Escherichia* sp., que produce O-acetil homoserina con alto rendimiento en un medio de cultivo cuando se fermenta en el medio. Además, la O-acetil homoserina puede convertirse, junto con metilmercaptano, mediante el proceso de dos etapas en L-metionina, con la producción concomitante de ácido acético.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> CJ Cheiljedang Corporation
- <120> Microorganismo productor de O-acetil-homoserina y el método de producción de O-acetil-homoserina usando el microorganismo
- 35 <130> OPA09052
- <150> US12/550.121
- <151> 28-08-2009
- 40 <160> 20
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 31
- 45 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 50 <223> Cebador directo para *ppc*
- <400> 1
- gccggaattc tgtcggatgc gatacttgcg c** **31**
- 55 <210> 2
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 606 540 T3

	<220>		
	<223> Cebador inverso para ppc		
5	<400> 2	<b>gaaggagctc agaaaaccct cgcgcaaaag</b>	<b>30</b>
	<210> 3		
	<211> 31		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo para ppc		
15	<400> 3	<b>gccggagctc tgtcggatgc gatacttgcg c</b>	<b>31</b>
	<210> 4		
	<211> 30		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso para ppc		
25	<400> 4	<b>gaagggtacc agaaaaccct cgcgcaaaag</b>	<b>30</b>
	<210> 5		
	<211> 30		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo para aspC		
35	<400> 5	<b>tccgagctca taagcgtagc gcatcaggca</b>	<b>30</b>
	<210> 6		
	<211> 30		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso para aspC		
45	<400> 6	<b>tccgagctcg tccacctatg ttgactacat</b>	<b>30</b>
	<210> 7		
	<211> 27		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo para asd		
55	<400> 7	<b>ccggaattcc caggagagca ataagca</b>	<b>27</b>
	<210> 8		
	<211> 28		
60	<212> ADN		

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador inverso para asd	
	<400> 8	
	<b>ctagtctaga tgctctatTT aactcccg</b>	<b>28</b>
10	<210> 9	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo para asd	
	<400> 9	
	<b>ctagtctaga ccaggagagc aataagca</b>	<b>28</b>
20	<210> 10	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador inverso para asd	
	<400> 10	
30	<b>ccggaattct gctctattta actcccg</b>	<b>27</b>
	<210> 11	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador directo para metX	
	<400> 11	
40	<b>ctgaaagctt atgaccgccg tgctcgcggg</b>	<b>30</b>
	<210> 12	
	<211> 30	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso para metX	
50	<400> 12	
	<b>cgccaagctt tcaactcctg agaaacgccc</b>	<b>30</b>
	<210> 13	
	<211> 1005	
55	<212> ADN	
	<213> <i>Deinococcus radioduran</i> R1	
	<400> 13	

ES 2 606 540 T3

```

atgaccgccg tgctcgcggg ccacgcctct gccctgctgc tgaccgaaga acccgactgt      60
tcggggccgc agacggtcgt tctcttccgg cgtgagccgc tgctgctcga ctgcggacgg      120
gcgctgagcg acgtgcgggt ggcctttcac acctacggca cgccgcgcgc cgacgccacg      180
ctggtgctgc acgccctgac cggcgacagc gcggtgcacg agtgggtggcc cgactttctg      240
ggcgcgggcc ggccactgga cccggcagac gactacgtgg tgtgcgcaa cgtcctcggc      300
gggtgcgccg gcacgacgag cgccgctgaa ctcgccgcca cctgttccgg accggtgccg      360
ctcagcctgc gcgacatggc ccgggtgggg cgcgccctgc tggattctct cggcgtgcga      420
cgggtgcggg tcatcggcgc gagcatgggc gggatgctcg cctacgcctg gctgctggag      480
tgccccgacc tgggtgaaaa ggccgtgatt ataggagccc cggcgcggca ctcgccctgg      540
gctattggac tgaacacggc ggcccgcagc gccattgccc tcgctcccgg cggcgagggg      600
ctgaaggtgg cgcgccagat tgccatgctc agttaccgca gccccgaaag cctaagccgc      660
acgcaggcgg ggcagcgcgt gccgggggtg cccgccgtta cgtcttacct gactaccaa      720
ggcgaaaaac tcgccgcccg cttcgacgag cagacctact gcgccctcac ctgggcgatg      780
gacgccttcc agccgagcag cgccgacctc aaagcgggtg gcgcgccggt actcgtcgtc      840
ggcatctcca gcgatctgct ctaccccgcc gccgaggtcc gcgcctgcgc cgccgagctt      900
ccccacgccg actactggga actgggcagc attcacggcc acgacgcctt tttgatggac      960
ccacaggact tgccggagcg ggtgggggcg tttctcagga gttga                          1005

```

- 5 <210> 14
- <211> 3125
- <212> ADN
- <213> *Escherichia coli* W3110
- <400> 14

ES 2 606 540 T3

gccgcaataa	tgtcggatgc	gatacttgcg	catcttatcc	gaccgacagt	gactcaaacg	60
atgcccaact	gtaggccgga	taaggcgctc	gcgccgcatac	cggcactgtt	gccaaactcc	120
agtgccgcaa	taatgtcggg	tgcgataact	gcgcatactta	tccgacctac	acctttgggtg	180
ttacttgggg	cgatttttta	acatttccat	aagttacgct	tatttaaagc	gtcgtgaatt	240
taatgacgta	aattcctgct	atcttattcg	ttgctgaagc	gatttcgcag	catttgacgt	300
caccgctttt	acgtggcttt	ataaaagacg	acgaaaagca	aagccccgagc	atattcgcgc	360
caatgcgagc	tgaaggatac	agggctatca	aacgataaga	tgggggtgtct	ggggtaatat	420
gaacgaacaa	tattccgcat	tgcgtagtaa	tgctcagtatg	ctcggcaaag	tgctgggaga	480
aaccatcaag	gatgcgttgg	gagaacacat	tcttgaacgc	gtagaaacta	tccgtaagtt	540
gtcgaatct	tcacgcgctg	gcaatgatgc	taaccgccag	gagttgctca	ccaccttaca	600
aaatttgcg	aacgacgagc	tgctgcccgt	tgcgcgtgcg	tttagtcagt	tcctgaacct	660
ggccaacacc	gccgagcaat	accacagcat	ttcgccgaaa	ggcgaagctg	ccagcaaccc	720
ggaaagtgatc	gccccgaccc	tgcgtaaact	gaaaaaccag	ccggaactga	gcgaagacac	780
catcaaaaaa	gcagtggaat	cgctgtcgtc	ggaactggtc	ctcacggctc	acccaaccga	840
aattaccgct	cgtaactga	tccacaaaat	ggtggaagtg	aacgcctggt	taaaacagct	900
cgataacaaa	gatatcgctg	actacgaaca	caaccagctg	atgcgtcgcc	tgccagctt	960
gatcgcccag	tcatggcata	ccgatgaaat	ccgtaagctg	cgccaagcc	cggtagatga	1020
agccaaatgg	ggctttgccg	tagtggaaaa	cagcctgtgg	caaggcgtac	caaattacct	1080
gcgcgaactg	aacgaacaac	tggaagagaa	cctcggctac	aaactgcccg	tcgaatttgt	1140
tccggtccgt	tttacttcgt	ggatgggcgg	cgaccgcgac	ggcaaccgga	acgtcactgc	1200
cgatatcacc	cgccacgtcc	tgctactcag	ccgctggaaa	gccaccgatt	tgttcctgaa	1260
agatattcag	gtgctgggtt	ctgaactgtc	gatggttgaa	gcgaccctg	aactgctggc	1320
gctggttggc	gaagaagggtg	ccgcagaacc	gtatcgctat	ctgatgaaaa	acctgcgttc	1380
tcgcctgatg	gcgacacagg	catggctgga	agcgcgcctg	aaaggcgaag	aactgcaaaa	1440
accagaaggc	ctgctgacac	aaaacgaaga	actgtgggaa	ccgctctacg	cttgcctacca	1500
gtcacttcag	gcgtgtggca	tgggtattat	cgccaacggc	gatctgctcg	acaccctgcg	1560
ccgcgtgaaa	tgtttcggcg	taccgctggt	ccgtattgat	atccgctcagg	agagcacgcg	1620
tcataccgaa	gcgctgggcg	agctgacccg	ctacctcggt	atcggcgact	acgaaagctg	1680

ES 2 606 540 T3

gtcagaggcc gacaaacagg cgttcctgat ccgcgaactg aactccaaac gtccgcttct 1740  
 gccgcgcaac tggcaaccaa gcgccgaaac gcgcgaagtg ctcgatacct gccaggtgat 1800  
 tgccgaagca ccgcaaggct ccattgccgc ctacgtgatc tcgatggcga aaacgccgtc 1860  
 cgacgtactg gctgtccacc tgctgctgaa agaagcgggt atcgggtttg cgatgccggt 1920  
 tgctccgctg tttgaaacct tcgatgatct gaacaacgcc aacgatgtca tgacccagct 1980  
 gctcaatatt gactggtatc gtggcctgat tcagggcaaa cagatggtga tgattggcta 2040  
 ttccgactca gcaaaaagat cgggagtgat ggcagcttcc tgggcgcaat atcaggcaca 2100  
 ggatgcatta atcaaaacct gcgaaaaagc gggatttag ctgacgttgt tccacggtcg 2160  
 cggcggttcc attggtcgcg gcggcgcacc tgctcatgcg gcgctgctgt cacaaccgcc 2220  
 aggaagcctg aaaggcggcc tgcgcgtaac cgaacagggc gagatgatcc gctttaaata 2280  
 tggcttgcca gaaatcaccg tcagcagcct gtcgctttat accggggcga ttctggaagc 2340  
 caacctgctg ccaccgccgg agccgaaaga gagctggcgt cgcattatgg atgaactgtc 2400  
 agtcatctgc tgcgatgtct accgcggcta cgtagctgaa aacaaagatt ttgtgcctta 2460  
 cttccgctcc gctacgccgg aacaagaact gggcaactg ccgttgggtt cacgtccggc 2520  
 gaaacgtcgc ccaaccggcg gcgtcgagtc actacgcgcc attccgtgga tcttcgctg 2580  
 gacgcaaac cgctctgatc tccccgcctg gctgggtgca ggtacggcgc tgcaaaaagt 2640  
 ggtcgaagac ggcaaacaga gcgagctgga ggctatgtgc cgcgattggc cattcttctc 2700  
 gacgcgtctc ggcatgctgg agatggtctt cgccaaagca gacctgtggc tggcgggaata 2760  
 ctatgaccaa cgcttgtag acaaacact gtggccgta ggtaaagagt tacgcaacct 2820  
 gcaagaagaa gacatcaaag tggtgctggc gattgccaac gattcccatc tgatggccga 2880  
 tctgccgtgg attgcagagt ctattcagct acggaatatt tacaccgacc cgctgaacgt 2940  
 attgcaggcc gagttgctgc accgctcccg ccaggcagaa aaagaaggcc aggaaccgga 3000  
 tctcgcgtc gaacaagcgt taatggtcac tattgccggg attgcccag gtatgctgaa 3060  
 taccggctaa tcttctctt ctgcaaacc tcgtgctttt gcgcgagggt tttctgaaat 3120  
 acttc 3125

<210> 15  
 <211> 1563  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli* W3110

<400> 15

gatccgtcca cctatgttga ctacatcadc aaccagatcg attctgacaa caaactgggc 60  
 gtaggttcag acgacaccgt tgctgtgggt atcgtttacc agttctaata gcacacctct 120  
 ttgttaaata ccgaaaaaac aggactttgg tctgttttt tttatacctt ccagagcaat 180  
 ctcacgtctt gcaaaaacag cctgcgtttt catcagtaat agttggaatt ttgtaaactc 240  
 cccgttacc tgatagcggg cttcccttct gtaaccataa tggaacctcg tcatgtttga 300

5

10

ES 2 606 540 T3

gaacattacc gccgctcctg ccgacccgat tctgggctctg gccgatctgt ttcgtgccga 360  
 tgaacgtccc ggcaaaatta acctcgggat tgggtgtctat aaagatgaga cgggcaaaac 420  
 cccggtactg accagcgtga aaaaggctga acagtatctg ctcgaaaatg aaaccaccaa 480  
 aaattacctc ggcattgacg gcatccctga atttggctgc tgcactcagg aactgctggt 540  
 tggtaaagggt agcgcctga tcaatgacaa acgtgctcgc acggcacaga ctccgggggg 600  
 cactggcgca ctacgcgtgg ctgccgattt cctggcaaaa aataccagcg ttaagcgtgt 660  
 gtgggtgagc aacccaagct ggccgaacca taagagcgtc ttaactctg caggctctgga 720  
 agttcgtgaa tacgcttatt atgatgcgga aaatcacact cttgacttcg atgcactgat 780  
 taacagcctg aatgaagctc aggctggcga cgtagtgtc tccatggct gctgccataa 840  
 cccaaccggt atcgacctc cgctggaaca atggcaaaac ctggcacaac tctccgttga 900  
 gaaaggctgg ttaccgctgt ttgacttcgc ttaccagggt tttgccgctg gtctggaaga 960  
 agatgctgaa ggactgcgcg ctttcgccc tatgcataaa gagctgattg ttgccagttc 1020  
 ctactctaaa aactttggcc tgtacaacga gcgtgttggc gcttgactc tggttgctgc 1080  
 cgacagtgaa accgttgatc gcgcattcag ccaaatgaaa gcggcgattc gcgctaacta 1140  
 ctctaacca ccagcacag gcgcttctgt tgttgccacc atcctgagca acgatgcgtt 1200  
 acgtgcgatt tgggaacaag agctgactga tatgcgccag cgtattcagc gtatgcgtca 1260  
 gttgttcgct aatacgtgc aggaaaaagg cgcaaacgc gacttcagct ttatcatcaa 1320  
 acagaacggc atgttctcct tcagtggcct gacaaaagaa caagtgtgc gtctgcgca 1380  
 agagtttggc gtatatgagg ttgcttctgg tcgcgtaaat gtggccggga tgaccacaga 1440  
 taacatggct ccgctgtgc aagcgattgt ggcaagtctg taagcattaa aaacaatgaa 1500  
 gcccgctgaa aagcgggctg agactgatga caaacgcaac attgcctgat gcgctacgct 1560  
 tat 1563

<210> 16  
 <211> 1556  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli* W3110

5

<400> 16

gaattcccag gagagcaata agcaactctc gcaccatgat tgcccgcctt cttttcggtt 60  
 cagtatgttt cagtacggac atgaaaatag gtaggtttcc gagcggatcc ataatcagga 120  
 tcaataaaac tgctgcagaa atgatttcat tcataactca aattccctga taattgccgc 180  
 ggactttctg cgtgctaaca aagcaggata agtcgcatta ctgatggctt cgctatcatt 240  
 gattaatttc acttgcgact ttggctgctt tttgtatggt gaaagatgtg ccaagaggag 300  
 accggcacat ttatacagca cacatctttg caggaaaaaa acgcttatga aaaatggttg 360  
 ttttatcggc tggcgcggta tggcggctc cgttctcatg caacgcattg ttgaagagcg 420  
 cgacttcgac gccattcgcc ctgtcttctt ttctacttct cagcttggcc aggctgcgcc 480  
 gtcttttggc ggaaccactg gcacacttca ggatgccttt gatctggagg cgctaaaggc 540

10

ES 2 606 540 T3

cctcgatate attgtgacct gtcagggcgg cgattatacc aacgaaatct atccaaagct 600  
 tcgtgaaagc ggatggcaag gttactggat tgacgcagca tcgtctctgc gcatgaaaga 660  
 tgacgccatc atcattcttg accccgtcaa tcaggacgtc attaccgacg gattaaataa 720  
 tggcatcagg acttttgttg gcggtaaactg taccgtaagc ctgatgttga tgtcgttggg 780  
 tggtttatte gccaatgatc ttgttgattg ggtgtccggt gcaacctacc aggccgcttc 840  
 cggcggtggt gcgcgacata tgcgtgagtt attaaccag atgggccatc tgtatggcca 900  
 tgtggcagat gaactcgcga ccccgctctc tgctattctc gatatcgaac gcaaagtcac 960  
 aaccttaacc cgtagcggtg agctgccggt ggataacttt ggcgtgccgc tggcgggtag 1020  
 cctgattccg tggatcgaca aacagctcga taacggtcag agccgcgaag agtggaaggg 1080  
 gcaggcggaa accaacaaga tcctcaacac atcttccgta attccggtag atggtttatg 1140  
 tgtgcgtgtc ggggcattgc gctgccacag ccaggcattc actattaaat tgaaaaaaga 1200  
 tgtgtctatt ccgaccgtgg aagaactgct ggctgcgcac aatccgtggg cgaaagtcgt 1260  
 tccgaacgat cgggaaatca ctatgcgtga gctaacccca gctgccgta ccggcacgct 1320  
 gaccacgccg gtaggccgcc tgcgtaagct gaatatggga ccagagttcc tgtcagcctt 1380  
 taccgtgggc gaccagctgc tgtggggggc gcgagagccg ctgcgtcggg tgcctcgtca 1440  
 actggcgtaa tctttattca ttaaactctg ggcgcgatgc cgcccctggt agtgcgtaat 1500  
 acaggagtaa gcgcagatgt ttcattgatt accgggagtt aaatagagca tctaga 1556

<210> 17  
 <211> 2464  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli* W3110

5

<400> 17

atgcgagtgt tgaagttcgg cggtacatca gtggcaaatg cagaacgttt tctgcgtggt 60  
 gccgatattc tggaaagcaa tgccaggcag gggcagggtg ccaccgtcct ctctgcccc 120  
 gccaaaatca ccaaccacct ggtggcgatg attgaaaaaa ccattagcgg ccaggatgct 180  
 ttaccaata tcagcgatgc cgaacgtatt tttgccgaac ttttgacggg actcgcgcc 240  
 gccagccggg ggttcccgcct ggcgcaattg aaaactttcg tcgatcagga atttgcccaa 300  
 ataaaacatg tcctgcatgg cattagtttg ttggggcagt gcccgatag catcaacgct 360  
 gcgctgattt gccgtggcga gaaaatgtcg atcgccatta tggccggcgt attagaagcg 420  
 cgcggtcaca acgttactgt tatcgatccg gtcgaaaaac tgctggcagt ggggcattac 480  
 ctcgaatcta ccgtcgatat tgcctgagtc acccgccgta ttgcggcaag ccgcattccg 540  
 gctgatcaca tggctgctgat ggcaggtttc accgccggtg atgaaaaagg cgaactggtg 600  
 gtgcttgac gcaacggttc cgactactct gctgcggtgc tggctgcctg tttacgcgcc 660  
 gattgttgcg agatttgac ggacgttgac ggggtctata cctgcgaccc gcgtcaggtg 720  
 cccgatgcga ggttgttgaa gtcgatgtcc taccaggaag cgatggagct ttcctacttc 780

10

ES 2 606 540 T3

```

ggcgctaaag ttcttcaccc ccgcaccatt acccccàtcg cccagttc̃ca gatcccttgc      840
ctgattaata ataccggaaa tcctcaagca ccaggtacgc tcattggtgc cagccgtgat      900
gaagacgaat taccggtcaa gggcatttcc aatctgaata acatggcaat gttcagcgtt      960
tctggtccgg ggatgaaagg gatggtcggc atggcggcgc gcgtctttgc agcgatgtca    1020
cgcgcccgta tttccgtggt gctgattacg caatcatctt ccgaatacag catcagtttc    1080
tgcgttccac aaagcgactg tgtgcgagct gaacgggcaa tgcaggaaga gttctacctg    1140
gaactgaaag aaggcttact ggagccgctg gcagtgacgg aacggctggc cattatctcg    1200
gtggtaggtg atggtatgcg caccttgctg gggatctcgg cgaaattctt tgccgactg     1260
gcccgcgcca atatcaacat tgtcgccatt gctcagggat cttctgaacg ctcaatctct    1320
gtcgtggtaa ataacgatga tgcgaccact ggcgtgcgcg ttactcatca gatgctgttc    1380
aataccgatc aggttatcga agtgtttggt attggcgtcg gtggcgttgg cgggtgcgctg    1440
ctggagcaac tgaagcgtca gcaaagctgg ctgaagaata aacatatcga cttacgtgtc    1500
tgcggtgttg ccaactcgaa ggctctgctc accaatgtac atggccttaa tctggaaaac    1560
tggcaggaag aactggcgca agccaaagag ccgtttaatc tcgggcgctt aattcgcctc    1620
gtgaaagaat atcatctgct gaaccggctc attggtgact gcacttcag ccaggcagtg    1680
gcggatcaat atgccgactt cctgcgcgaa ggtttccacg ttgtcacgcc gaacaaaaag    1740
gccaacacct cgtcgatgga ttactaccat cagttgctgt atgcggcggg aaaatcgcgg    1800
cgtaaattcc tctatgacac caacgttggg gctggattac cggttattga gaacctgcaa    1860
aatctgctca atgcaggtga tgaattgatg aagttctccg gcattctttc tggttcgcctt    1920
tcttatatct tcggcaagtt agacgaaggc atgagtttct ccgaggcgac cacgctggcg    1980
cgggaaatgg gttataccga accggaccgg cgagatgatc tttctggtat ggatgtggcg    2040
cgtaaactat tgattctcgc tcgtgaaacg ggacgtgaac tggagctggc ggatattgaa    2100
attgaacctg tgctgcccgc agagttaaac gccgaggggtg atggtgccgc ttttatggcg    2160
aatctgtcac aactcgacga tctctttgcc gcgcgcgtgg cgaaggcccg tgatgaagga    2220
aaagttttgc gctatggttg caatattgat gaagatggcg tctgccgcgt gaagattgcc    2280
gaagtggatg gtaatgatcc gctgttcaaa gtgaaaaatg gcgaaaacgc cctggccttc    2340
tatagccact attatcagcc gctgccgttg gtactgcgcg gatatggtgc gggcaatgac    2400
gttacagctg ccggtgtctt tgctgatctg ctacgtaccc tctcatggaa gttaggagtc    2460
tgaa

```

```

5 <210> 18
  <211> 334
  <212> PRT
  <213> Deinococcus radiodurans

10 <220>
  <221> PÉPTIDO

  <222> (1)..(334)
  <223> Péptido de homoserina o-acetiltransferasa con la base de datos Uniprot N.º Q9RVZ8

15 <400> 18

```

ES 2 606 540 T3

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

<210> 19  
<211> 379  
<212> PRT  
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

5

<220>

ES 2 606 540 T3

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(379)

<223> Péptido de homoserina O-acetiltransferasa con N.º de acceso del GenBank NP\_249081

5

<400> 19

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

```

                290                295                300
Val Arg Thr Leu Glu Gly Val Glu Ala Asp Phe Cys Leu Met Ser Phe
305                310                315
Thr Thr Asp Trp Arg Phe Ser Pro Ala Arg Ser Arg Glu Ile Val Asp
                325                330                335
Ala Leu Ile Ala Ala Lys Lys Asn Val Ser Tyr Leu Glu Ile Asp Ala
                340                345                350
Pro Gln Gly His Asp Ala Phe Leu Met Pro Ile Pro Arg Tyr Leu Gln
                355                360                365
Ala Phe Ser Gly Tyr Met Asn Arg Ile Ser Val
                370                375

```

5  
 <210> 20  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium smegmatis*

10  
 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(380)  
 <223> Péptido de homoserina O-acetiltransferasa con N.º de acceso del GenBank YP\_886028

<400> 20

```

Met Thr Ile Ile Glu Glu Arg Ala Thr Asp Thr Gly Met Ala Thr Val
 1                5                10                15
Pro Leu Pro Ala Glu Gly Glu Ile Gly Leu Val His Ile Gly Ala Leu
                20                25                30
Thr Leu Glu Asn Gly Thr Val Leu Pro Asp Val Thr Ile Ala Val Gln
                35                40                45
Arg Trp Gly Glu Leu Ala Pro Asp Arg Gly Asn Val Val Met Val Leu
                50                55                60
His Ala Leu Thr Gly Asp Ser His Val Thr Gly Pro Ala Gly Asp Gly
                65                70                75                80
His Pro Thr Ala Gly Trp Trp Asp Gly Val Ala Gly Pro Gly Ala Pro
                85                90                95
Ile Asp Thr Asp His Trp Cys Ala Ile Ala Thr Asn Val Leu Gly Gly
                100                105                110
Cys Arg Gly Ser Thr Gly Pro Gly Ser Leu Ala Pro Asp Gly Lys Pro
                115                120
Trp Gly Ser Arg Phe Pro Gln Ile Thr Ile Arg Asp Gln Val Ala Ala
                130                135                140
Asp Arg Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Ile Thr Glu Val Ala Ala Val
                145                150                155                160
Val Gly Gly Ser Met Gly Gly Ala Arg Ala Leu Glu Trp Leu Val Thr
                165                170                175
His Pro Asp Asp Val Arg Ala Gly Leu Val Leu Ala Val Gly Ala Arg
                180                185                190
Ala Thr Ala Asp Gln Ile Gly Thr Gln Ser Thr Gln Val Ala Ala Ile

```

15

ES 2 606 540 T3

	195					200						205				
Lys	Ala	Asp	Pro	Asp	Trp	Gln	Gly	Gly	Asp	Tyr	His	Gly	Thr	Gly	Arg	
	210					215					220					
Ala	Pro	Thr	Glu	Gly	Met	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	Phe	Ala	His	Leu	Thr	
225					230					235					240	
Tyr	Arg	Gly	Glu	Glu	Glu	Leu	Asp	Asp	Arg	Phe	Ala	Asn	Thr	Pro	Gln	
				245					250					255		
Asp	Asp	Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Gly	Gly	Arg	Tyr	Ala	Val	Gln	Ser	Tyr	
			260					265					270			
Leu	Glu	Tyr	Gln	Gly	Gly	Lys	Leu	Ala	Arg	Arg	Phe	Asp	Pro	Gly	Thr	
		275					280					285				
Tyr	Val	Val	Leu	Ser	Asp	Ala	Leu	Ser	Ser	His	Asp	Val	Gly	Arg	Gly	
	290					295					300					
Arg	Gly	Gly	Val	Glu	Ala	Ala	Leu	Arg	Ser	Cys	Pro	Val	Pro	Val	Val	
305					310					315					320	
Val	Gly	Gly	Ile	Thr	Ser	Asp	Arg	Leu	Tyr	Pro	Ile	Arg	Leu	Gln	Gln	
				325					330					335		
Glu	Leu	Ala	Glu	Leu	Leu	Pro	Gly	Cys	Gln	Gly	Leu	Asp	Val	Val	Asp	
			340					345					350			
Ser	Ile	Tyr	Gly	His	Asp	Gly	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Glu	Leu	Val	Gly	
		355					360					365				
Lys	Leu	Ile	Arg	Arg	Thr	Leu	Glu	Leu	Ala	Gln	Arg					
	370					375					380					

## REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Escherichia* sp., capaz de producir O-acetil homoserina con alto rendimiento, con sobreexpresión de genes que codifican la homoserina acetil transferasa, la aspartoquinasa, la homoserina deshidrogenasa, la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la aspartato aminotransferasa y la aspartato semialdehído deshidrogenasa, en la que la cepa de *Escherichia* sp., se caracteriza, además, por la delección de genes *metB*, *thrB*, *metJ* y *metA*.
2. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la sobreexpresión de genes se consigue mediante transformación con un plásmido que porta un gen correspondiente, incrementando un número de copias de un gen correspondiente, empleando un promotor fuerte para un gen correspondiente, o mediante una mutación en un promotor preexistente para un gen correspondiente.
3. La cepa de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la sobreexpresión de genes que codifican la homoserina acetil transferasa, la aspartoquinasa y la homoserina deshidrogenasa se consigue introduciendo un plásmido que porta genes *metX* y *thrA*.
4. La cepa de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la aspartato aminotransferasa y la aspartato semialdehído deshidrogenasa se codifican por genes respectivos, estando cada uno de ellos ubicado en dos o más copias en un genoma de la cepa.
5. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que cada una de las enzimas homoserina acetil transferasa, aspartoquinasa y homoserina deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa y aspartato semialdehído deshidrogenasa está codificada por genes *metX*, *thrA*, *ppc*, *aspC* y *asd* de *Escherichia coli*.
6. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la homoserina acetil transferasa se selecciona de homoserina acetil transferasas de *Corynebacterium* sp., *Leptospira* sp., *Deinococcus* sp., *Pseudomonas* sp., y *Mycobacterium* sp.
7. La cepa de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la homoserina acetil transferasa se selecciona de homoserina acetil transferasas de *Corynebacterium glutamicum*, *Leptospira meyeri*, *Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium smegmatis*.
8. La cepa de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la homoserina acetil transferasa tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 18, 19 o 20.
9. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la homoserina acetil transferasa es una homoserina acetil transferasa de *Deinococcus radiodurans* que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 18.
10. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, que se prepara usando una cepa capaz de producir L-treonina, L-isoleucina o L-lisina.
11. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, que pertenece a *Escherichia coli*.
12. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, que se prepara usando *E. coli* CJM-X/pthrA(M)-CL depositada con el N.º de acceso KCCM 10921 P.
13. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, que se prepara usando *E. coli* CJM2-X/pthrA(M)-CL depositada con el N.º de acceso KCCM 10925P.
14. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, que se prepara usando *E. coli* FTR2533 depositada con el N.º de acceso KCCM 10541.
15. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, que se deposita con el N.º de acceso KCCM 11025P.
16. Un método de producción de O-acetil homoserina en un medio de cultivo, que comprende fermentar la cepa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en el medio de cultivo.
17. Un método de producción de L-metionina y acetato, que comprende: (a) fermentar la cepa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para producir O-acetil homoserina; (b) separar la O-acetil homoserina; y (c) convertir la O-acetil homoserina, junto con metilmercaptano, en L-metionina y acetato en presencia de una enzima seleccionada de un grupo que consiste en cistationina gamma sintasa, O-acetil homoserina sulfhidrilasa y O-succinil homoserina sulfhidrilasa.

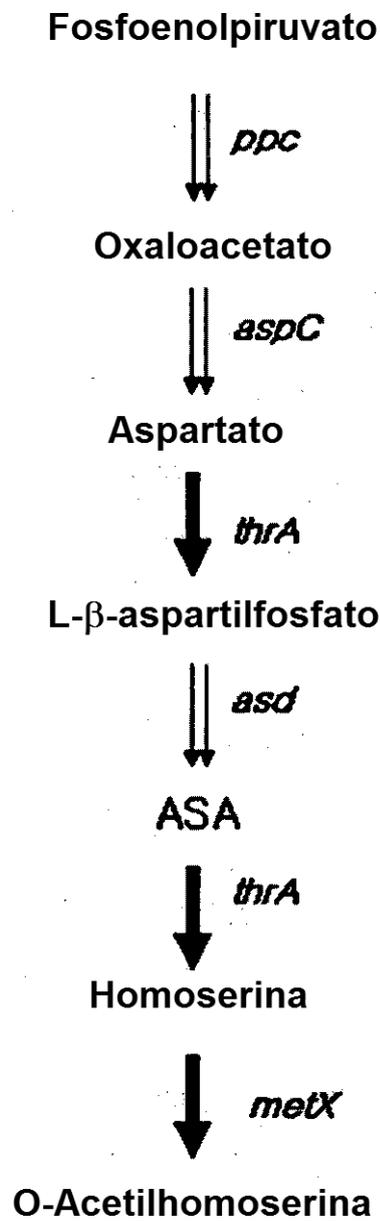


FIG. 1

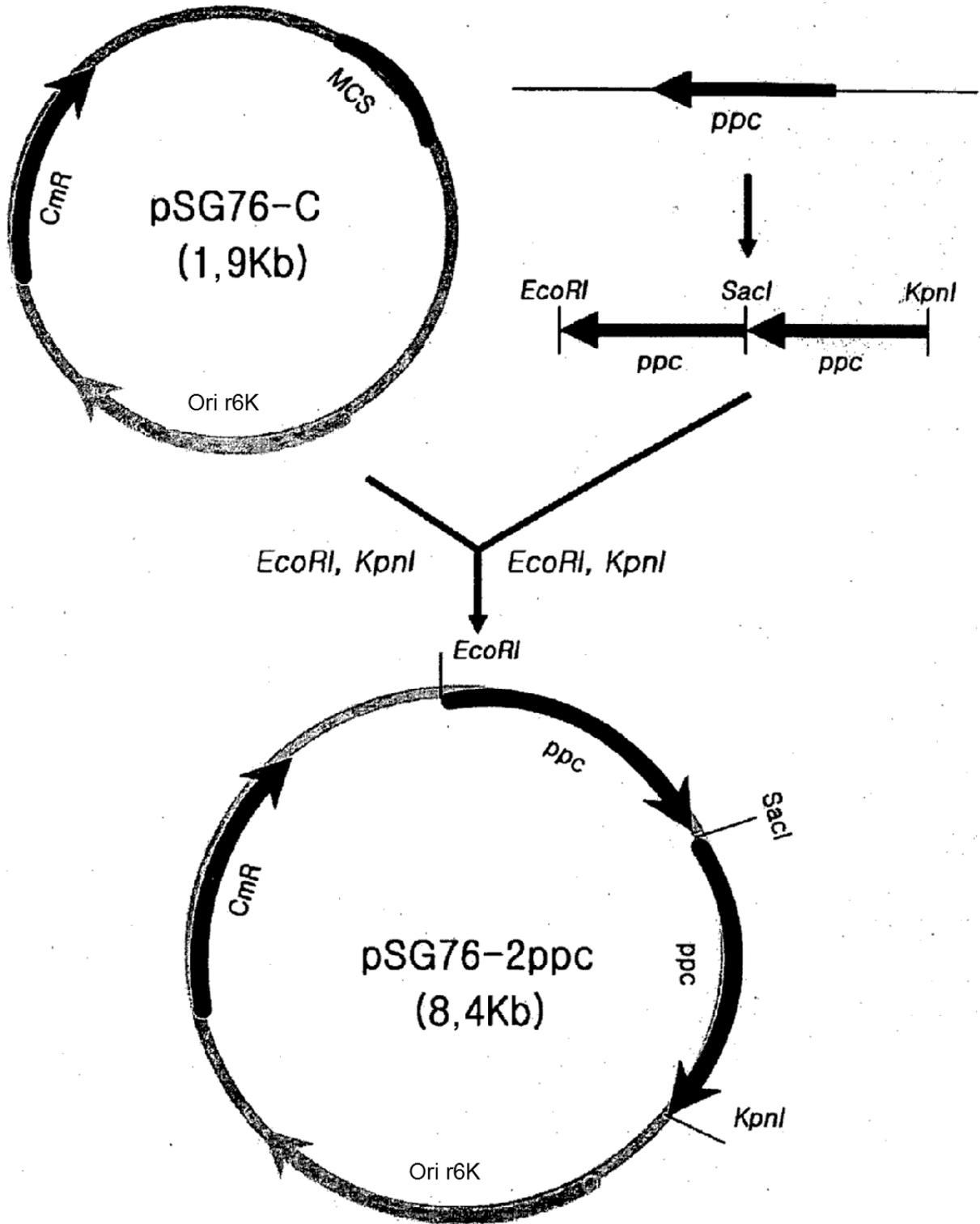


FIG. 2

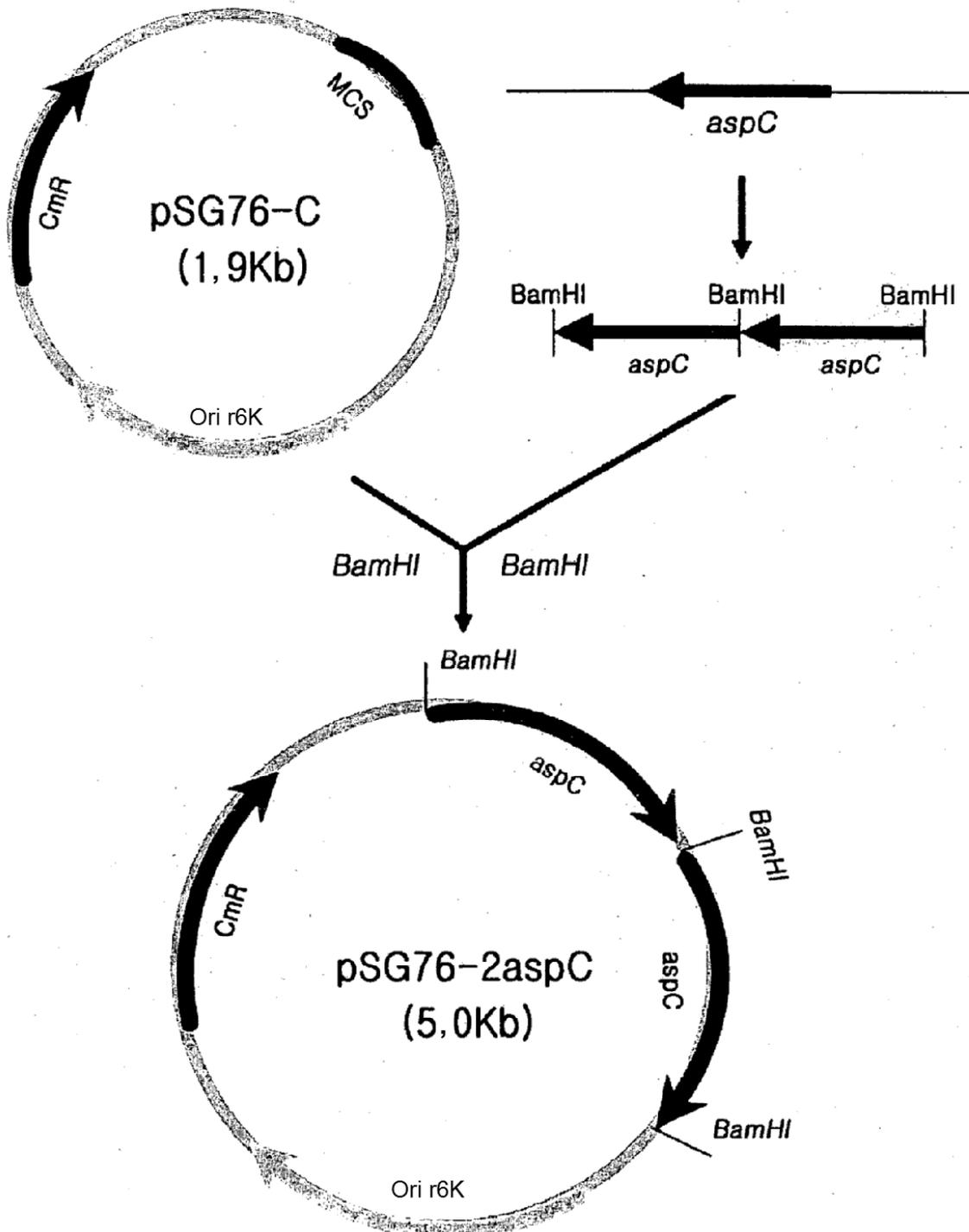


FIG. 3

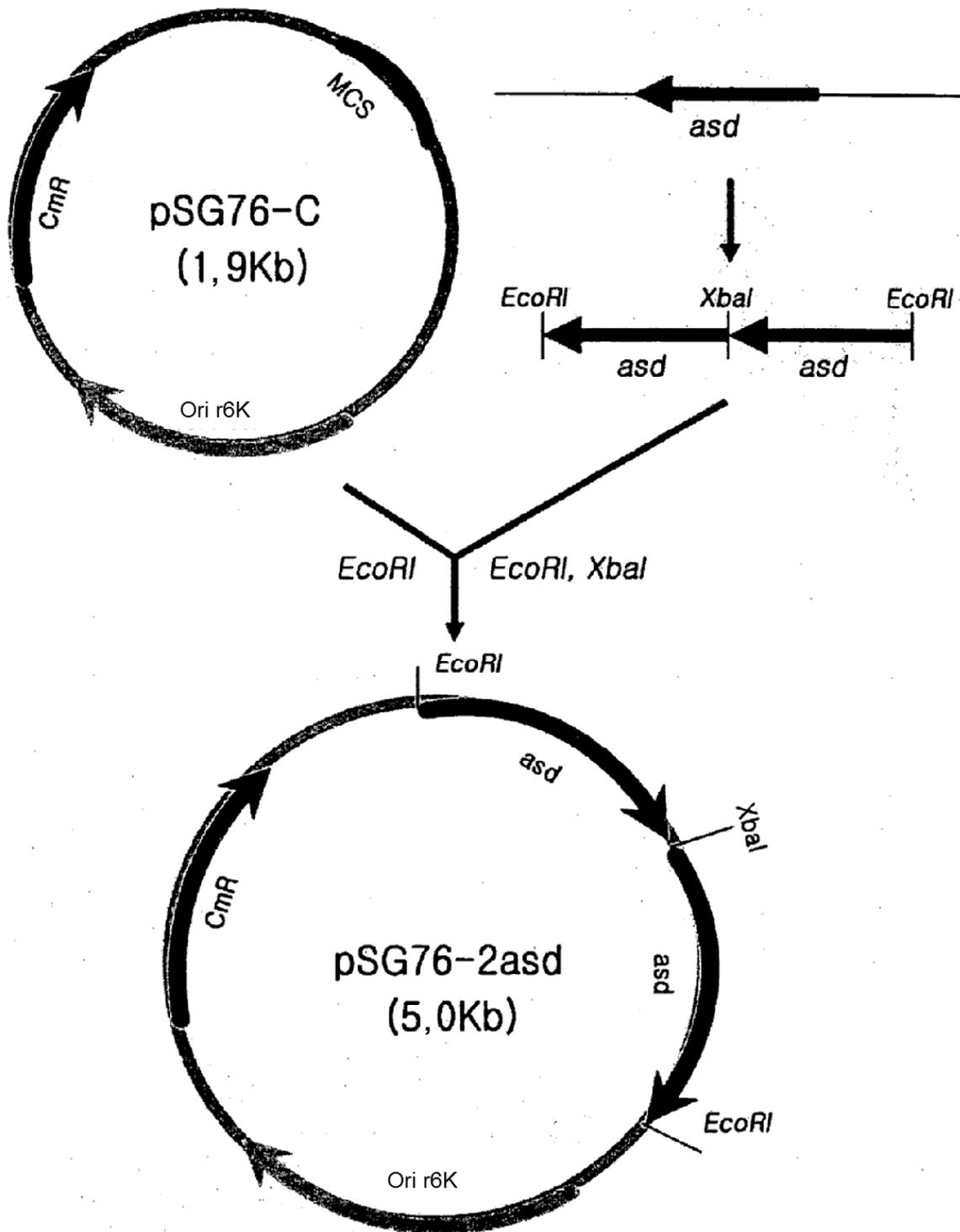


FIG. 4

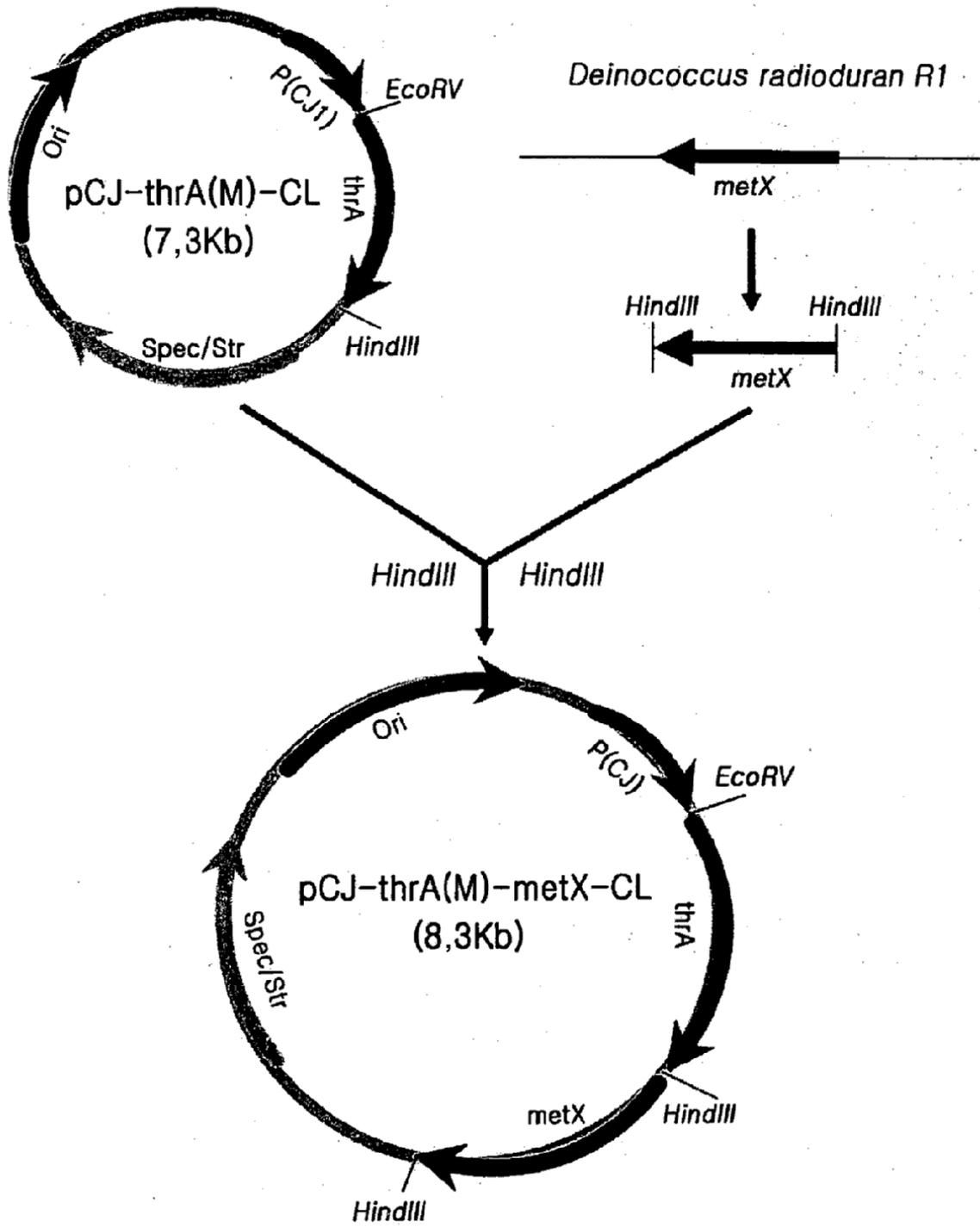


FIG. 5