

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 451**

51 Int. Cl.:

C07K 14/245 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 13/06 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/KR2011/009966**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12087039**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11852010 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2657250**

54 Título: **Variante de polipéptido que tiene actividad homoserina acetiltransferasa y microorganismo que expresa el mismo**

30 Prioridad:

21.12.2010 KR 20100131953

21.12.2011 KR 20110139228

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

18.01.2018

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
292, Ssangnim-dong, Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 650 451 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

Variante de polipéptido que tiene actividad homoserina acetiltransferasa y microorganismo que expresa el mismo

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

- 5 La presente invención se define mediante el conjunto de reivindicaciones adjuntas y se refiere a un polipéptido que se modifica para tener actividad homoserina acetiltransferasa, a un polinucleótido que codifica al mismo, a un vector recombinante que comprende el polinucleótido, a un microorganismo que se transforma con el vector recombinante, y a un procedimiento para producir O-acetil homoserina usando el microorganismo.

2. Descripción de la técnica relacionada

- 10 La metionina es uno de los aminoácidos esenciales en el cuerpo, y se ha usado ampliamente como un alimento para animales y aditivo alimenticio, así como un componente de soluciones acuosas médicas y otras materias primas para productos medicinales. La metionina actúa como un precursor de colina (lecitina) y creatina, y también se usa como una materia prima para la síntesis de cisteína y taurina. Además, funciona como un donador de azufre.

- 15 La S-adenosil-metionina proviene de la L-metionina y sirve como un donador de metilo en el cuerpo, y está implicada en la síntesis de diversos neurotransmisores en el cerebro. Se ha descubierto que la metionina y/o la S-adenosil-L-metionina (SAM) evitan la acumulación de lípidos en el hígado y las arterias y son eficaces para el tratamiento de la depresión, inflamación, hepatopatías y dolor muscular.

La metionina se puede sintetizar de manera química o biológica para su uso en la alimentación de animales, los alimentos y las medicinas.

- 20 En la síntesis química, la L-metionina se produce principalmente mediante la hidrólisis de 5-5β-metilmercaptoetil) -hidantoína. Sin embargo, la metionina sintetizada químicamente tiene una desventaja de que solo se produce en forma de mezcla del tipo L y del tipo D.

- 25 En relación a la síntesis biológica de la L-metionina, La Publicación de Patente de Estados Unidos N.º US2005/0054060A1 describe un procedimiento de síntesis de homocisteína o metionina directamente usando H₂S o CH₃SH, aunque no se usa cisteína, mediante la modificación de cistationina sintasa para la preparación de microorganismos. En este procedimiento, la cistationina sintasa modificada se introduce directamente en las células para sintetizar metionina de acuerdo con el proceso de síntesis intracelular de metionina. Sin embargo, existen problemas prácticos en que este procedimiento produce solo una pequeña cantidad de metionina debido a las acciones inhibitorias de la metionina sintetizada que resultan del uso de vías metabólicas intracelulares de metionina, y H₂S o CH₃SH también provoca citotoxicidad.

El documento WO 2004/076659 A2 desvela procedimientos para la producción de metionina mediante la modificación de la secuencia de la O-succiniltransferasa de *E. coli*.

Zubieta C y col. (Journal of Biological Chemistry, vol. 283, n.º 12, 21 de marzo de 2008) desvela una estructura cristalina de rayos x de metA de *Bacillus cereus* en complejo con homoserina.

- 35 Para solucionar estos problemas, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento de dos etapas para convertir el precursor de L-metionina en L-metionina mediante reacción enzimática (PCT/KR2007/003650). Este procedimiento de dos etapas puede solucionar los problemas anteriores de citotoxicidad de H₂S o CH₃SH y el proceso de inhibición metabólica mediante la L-metionina producida. Por otra parte, este proceso se caracteriza porque es muy eficaz para producir solo L-metionina de manera selectiva, y no una forma de mezcla de D-metionina y L-metionina.

- 40 En este procedimiento de dos etapas, se pueden usar O-succinil homoserina y O acetil homoserina como el precursor de metionina. Durante la reacción de conversión de metionina, la O-acetil homoserina tiene ventaja sobre la O-succinil homoserina en términos de rendimiento de producción de la proporción de precursor frente a metionina. Específicamente, se pueden producir 0,91 moles de metionina a partir de 1 mol de O-acetil homoserina, mientras que solo se pueden producir 0,67 moles de metionina a partir de 1 mol de O-succinil homoserina. Por lo tanto, el coste de producción del producto final de metionina se puede reducir usando O-acetil homoserina como el precursor de metionina, y el alto rendimiento de producción de O-acetil homoserina es un factor crucial para la producción en masa de metionina.

- 50 Mientras tanto, el uso de O-acetil homoserina o O-succinil homoserina como el precursor de metionina depende del tipo de microorganismo. En detalle, los microorganismos que pertenecen a los géneros *Escherichia*, *Enterobacteria*, *Salmonella*, y *Bacillus* producen O-succinil homoserina a partir de homoserina y succinil-coA mediante L-homoserina O-succiniltransferasa (Biochemistry. 26 de octubre de 1999; 38(43): 14416-23), y los microorganismos que pertenecen a los géneros *Corynebacterium*, *Leptospira*, *Deinococcus*, *Pseudomonas*, y *Mycobacterium* producen O-acetil-homoserina a partir de homoserina y acetil-coA mediante L-homoserina O-acetiltransferasa (Journal of

Bacteriology, Mar. 2002, p. 1277 (-1286).

5 Por lo tanto, la expresión de O-acetil homoserina transferasa mediante la introducción de metX, un gen extraño, se requiere para la biosíntesis de O-acetil homoserina que usa microorganismos del género *Escherichia* que se usan para producir proteínas recombinantes con fines experimentales e industriales. Sin embargo, existen problemas relacionados con actitudes negativas de los consumidores hacia la introducción de genes extraños en microorganismos usado para la producción de productos alimenticios, y con la demostración de seguridad de la introducción de genes extraños.

10 Por consiguiente, los presentes inventores se han esforzado en preparar una cepa del género *Escherichia* que produce O-acetil homoserina ventajosa en términos del rendimiento de producción sin la introducción de genes extraños. Como resultado, los inventores han descubierto que la actividad homoserina succiniltransferasa se puede convertir en la actividad homoserina acetiltransferasa mediante el uso de un polipéptido modificado preparado mediante sustitución de ácido glutámico por el aminoácido en la posición 111 de la O-succinil homoserina transferasa que es de *E.coli*, completando así la presente invención.

Sumario de la invención

15 Un objeto de la presente invención es proporcionar un polipéptido modificado, en el que el polipéptido que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa se convierte para tener actividad homoserina acetiltransferasa.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un polinucleótido que codifica el polipéptido modificado anteriormente.

20 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un vector recombinante que comprende las secuencias de polinucleótidos enlazadas de manera operativa al polinucleótido anterior.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un microorganismo que comprende el polinucleótido anterior.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un microorganismo que transforma al vector recombinante enlazado de manera operativa al polinucleótido anterior.

25 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir O-acetil homoserina usando el microorganismo que expresa el polipéptido modificado que tiene actividad homoserina acetiltransferasa.

Breve descripción de los dibujos

30 La FIG. 1 es un diagrama que muestra un vector recombinante que está enlazado de manera operativa con un polinucleótido que codifica el polipéptido modificado de acuerdo con la presente invención;

La FIG. 2 muestra la comparación de homología de las secuencias primarias de aminoácidos de homoserina O-succiniltransferasa entre variantes de *E.coli*;

35 Las FIGs. 3 y 4 muestran las comparaciones de homología de las secuencias primarias de aminoácidos del mutante de homoserina O-succiniltransferasa resistente a la regulación de retroalimentación mediante metionina, en las que las secuencias primarias de aminoácidos de la homoserina O-succiniltransferasa de tipo silvestre, el mutante met10 y el met11A de homoserina O-succiniltransferasa resistente a la regulación de retroalimentación desvelados en la Publicación de PCT N.º WO 2008/127240, y el mutante de homoserina O-succiniltransferasa resistente a la regulación de retroalimentación desvelado en la Publicación de PCT N.º WO 2005/108561 se usaron para la comparación; y

40 La FIG. 5 es un diagrama que muestra la preparación de un casete de delección de FRT de una etapa mediante PCR de solapamiento con el fin de sustituir el promotor pro por el promotor acs en el cromosoma.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

45 En un aspecto para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona un polipéptido modificado que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:17 o al menos el 95 % de homología con la misma, en la que el aminoácido en la posición 111 a partir del aminoácido del punto de partida, metionina, de la secuencia se sustituye con ácido glutámico y el aminoácido en la posición 112 de la secuencia se sustituye con treonina o histidina.

50 Tal como se usa en el presente documento, el polipéptido que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa se refiere a un polipéptido que tiene una actividad de síntesis de O-succinil homoserina a partir de homoserina y succinil-coA presente en las vías de biosíntesis de metionina, tal como se muestra en el siguiente esquema de reacción.



El polipéptido que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa puede ser un polipéptido recombinante que es de un microorganismo de los géneros *Enterobacteria*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, o *Escherichia*,

preferentemente, un polipéptido recombinante que tiene actividad homoserina succiniltransferasa que es de un microorganismo del género *Escherichia*, y más preferentemente, un polipéptido recombinante que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa que es de *E.coli*.

5 En la presente invención, el polipéptido que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa puede incluir un polipéptido que tiene actividad homoserina succiniltransferasa que está compuesto de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 o al menos el 95 % de homología con la misma, siempre que tenga la actividad mostrada en el esquema de reacción anterior.

10 En los Ejemplos de la presente invención, se comparó la homología de las secuencias de aminoácidos de homoserina O-succinil transferasa entre diferentes especies de *E. coli*. Como resultado, hubo menos del 5 % de variación en los polipéptidos de homoserina O-succiniltransferasa entre diferentes especies de *E.coli* (es decir, que tienen al menos el 95 % de homología), pero no hubo diferencias significativas en la actividad homoserina O-succiniltransferasa (FIG. 2). Estos resultados indican que los polipéptidos que tienen el 95 % o más de homología con el polipéptido de la SEQ ID NO: 17 de la presente invención también tienen una actividad homoserina succiniltransferasa idéntica, que es evidente para los expertos en la materia y se visualiza por los presentes inventores.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido modificado" se refiere a un polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa mediante sustitución de una parte de las secuencias de aminoácido del polipéptido que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa, a diferencia del tipo silvestre. Es decir, el polipéptido modificado de la presente invención se refiere a un polipéptido modificado que tiene la misma actividad que en el siguiente esquema de reacción, que tiene una especificidad de sustrato por acetil-coA en lugar de por succinil-coA mediante sustitución de una parte de las secuencias de aminoácido del polipéptido que tiene actividad O-succiniltransferasa.



25 En la presente invención, el polipéptido modificado anteriormente es un polipéptido modificado en el que el aminoácido en la posición 111 de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 17 o un polipéptido que tiene el 95 % o más de homología de secuencia con la misma se sustituye con ácido glutámico (SEQ ID NO: 18), y el aminoácido en la posición 112 del polipéptido se sustituye adicionalmente con treonina (SEQ ID NO: 19) o histidina (SEQ ID NO: 20).

30 Se descubrió que la sustitución adicional de treonina o histidina para el aminoácido leucina en la posición 112 mejora la actividad homoserina acetiltransferasa (Tablas 2 y 3).

De acuerdo con una realización preferida, el polipéptido modificado anterior puede ser un polipéptido que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 19 o 20.

35 En los Ejemplos de la presente invención, se preparan un plásmido capaz de expresar un polipéptido en el que el aminoácido glicina en la posición 111 de una homoserina succiniltransferasa codificada por el gen *metA* de *E.coli* compuesto por la secuencia de nucleótidos representado por la SEQ ID NO: 39 se sustituye con ácido glutámico, y un plásmido capaz de expresar un polipéptido en el que el aminoácido en la posición 112 además de la sustitución anterior, se sustituye con treonina o histidina (Ejemplo 2).

40 Además, los Ejemplos experimentales de la presente invención demostraron que solo se producía O-succinil homoserina mediante CJM2 pCL_Pcj1_metA(ts) y CJM3 pCL_Pcj1_metA(ts) transformada con un plásmido que incluye el gen *metA* de tipo silvestre (SEQ ID NO: 39). Por el contrario, solo se acumuló O-acetil homoserina mediante una cepa que se transforma con un plásmido que incluye el gen que codifica el polipéptido modificado de la presente invención (Ejemplo experimental 2, Tablas 2 y 3).

45 Por lo tanto, un microorganismo que expresa el polipéptido modificado de la presente invención es ventajoso en que es capaz de producir O-acetil homoserina como un precursor de metionina capaz de la producción de alto rendimiento sin introducción de genes extraños para la actividad homoserina acetiltransferasa.

50 En la presente invención, el polipéptido modificado anteriormente puede ser resistente a la regulación de retroalimentación mediante la metionina que resulta de la sustitución de una parte de los aminoácidos del péptido que tiene actividad homoserina succiniltransferasa. Es decir, la mayoría de la actividad de homoserina succiniltransferasa se regula a través de la inhibición de retroalimentación mediante una pequeña cantidad de metionina en un medio, y por tanto el polipéptido de la presente invención puede ser resistente a la regulación de retroalimentación mediante metionina para la producción en masa de O-acetil homoserina.

55 En la presente invención, la sustitución de aminoácidos para evitar la regulación de retroalimentación mediante metionina se puede realizar de acuerdo con el procedimiento desvelado en la Publicación de PCT N.º WO 2008/127240. En detalle, la regulación de retroalimentación mediante metionina se puede evitar mediante la sustitución de prolina por el aminoácido en la posición 29, la sustitución de glicina por el aminoácido en la posición 114, la sustitución de serina por el aminoácido en la posición 140 del polipéptido que tiene actividad homoserina

succiniltransferasa, o una o más combinaciones de las tres sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, se pueden sustituir dos o más, y lo más preferentemente los tres aminoácidos.

De acuerdo con una realización preferida, el polipéptido modificado resistente a la regulación de retroalimentación mediante metionina puede ser un polipéptido modificado que tiene una secuencia de aminoácidos cualquiera seleccionada de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 22 o 23.

En los Ejemplos de la presente invención, los aminoácidos en las posiciones 29, 114 y 140 del polipéptido recombinante que tiene actividad homoserina succiniltransferasa que está codificado por el gen *metA* de *E.coli* se sustituyeron por prolina, glicina y serina, respectivamente para evitar la regulación de retroalimentación por metionina. Además, se construyeron plásmidos que incluyen polinucleótidos que codifican polipéptidos modificados que tienen actividad homoserina acetiltransferasa, que son [pCL_Pcj1_metA#11(EL)] preparados mediante sustitución de ácido glutámico por el aminoácido en la posición 111, [pCL_Pcj1_metA#11(ET)] preparado mediante sustitución de ácido glutámico y treonina para los aminoácidos en las posiciones 111 y 112, y [pCL_Pcj1_metA#11(EH)] preparado mediante la sustitución de ácido glutámico e histidina por los aminoácidos en las posiciones 111 y 112 (Ejemplo 3).

Además, Los Ejemplos experimentales de la presente invención demostraron que entre las cepas que expresan los polipéptidos modificados resistentes a la regulación de retroalimentación mediante metionina, las cepas CJM2 pCL_Pcj1_metA(#11)EH y CJM3 pCL_Pcj1_metA(#11)EH preparadas mediante sustitución de ácido glutámico e histidina por los aminoácidos en las posiciones 111 y 112 demostraron altas productividades de O-acetil homoserina de 11,1 g/l y 24,8 g/l, respectivamente, y estas acumulaciones de O-acetil homoserina son similares a aquellas mediante introducción del gen extraño de homoserina acetiltransferasa (Ejemplo experimental 2, Tablas 2 y 3).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido modificado, o un vector recombinante que comprende secuencias de polinucleótidos enlazadas de manera operativa al polinucleótido.

En la presente invención, el polinucleótido anterior es un polímero de nucleótidos compuesto de monómeros de nucleótidos unidos de manera covalente en una cadena, y los ejemplos de los mismos son hebras de ADN o ARN que tienen una longitud predeterminada o más larga, y es un polinucleótido que codifica el polipéptido modificado anterior.

En la presente invención, el polinucleótido anterior puede ser un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos cualquiera de las SEQ ID NO: 25, 26, 28 y 29.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión anterior "vector recombinante" es un medio para expresar el polipéptido modificado mediante la introducción de ADN en una célula hospedadora con el fin de preparar un microorganismo que expresa el polipéptido modificado de la presente invención, y los vectores de expresión conocidos tales como vector de plásmido, vector de cósmido y vector de bacteriófago se pueden usar. El vector se puede preparar fácilmente por los expertos en la materia de acuerdo con cualquier procedimiento conocido usando la tecnología del ADN recombinante.

En la presente invención, el vector recombinante puede ser un vector pACYC177, pACYC184, pCL1920, pECCG117, pUC19, pBR322, o pMW118, y preferentemente el vector pCL1920.

La expresión "enlazado de manera operativa" se refiere a que una secuencia reguladora de la expresión está enlazada de tal manera que regula la transcripción y la traducción de una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido modificado, e incluye mantener un marco de traducción preciso de manera que el polipéptido modificado codificado por la secuencia de polinucleótidos se produzca cuando la secuencia de polinucleótidos se exprese bajo el control de secuencias reguladoras (incluyendo un promotor).

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido modificado anterior y un microorganismo que se transforma con el vector recombinante enlazado de manera operativa al polinucleótido que codifica el polipéptido modificado anterior.

Tal como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a un procedimiento en el que se introduce un gen en una célula hospedadora para su expresión en la célula hospedadora. El gen transformado, si está en el estado de ser expresado en la célula hospedadora, se puede insertar en el cromosoma de la célula hospedadora o puede estar de manera independiente del cromosoma.

Además, el gen incluye ADN o ARN como un polinucleótido capaz de codificar un polipéptido. El gen se puede introducir en cualquier tipo, siempre que se pueda introducir en la célula hospedadora y expresarse en la misma. Por ejemplo, el gen se puede introducir en la célula hospedadora en el tipo de casete de expresión que es una construcción de polinucleótido que incluye elementos completos para la expresión del gen por sí mismo. Normalmente, el casete de expresión incluye un promotor, una señal de terminación de la transcripción, un sitio de unión a ribosomas y una señal de terminación de la traducción, que están enlazados de manera operativa al gen. El casete de expresión puede estar en el tipo de vector de expresión capaz de autorreplicarse. El gen anterior también se puede introducir en la célula hospedadora por sí mismo o en el tipo de construcción de polinucleótido para

enlazarse de manera operativa a la secuencia requerida para la expresión en la célula hospedadora.

El microorganismo anterior es un microorganismo procarionta o eucarionta que es capaz de expresar el polipéptido modificado mediante la inclusión del polinucleótido que codifica el polipéptido modificado o mediante la transformación con el vector recombinante enlazado de manera operativa al polinucleótido que codifica el polipéptido modificado, y por ejemplo, puede ser un microorganismo que pertenece a los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Erwinia*, *Schizosaccharomyces*, *Enterobacteria*, *Zygosaccharomyces*, *Leptospira*, *Deinococcus*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Mucor*, *Torulopsis*, *Methylobacter*, *Salmonella*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium* o *Corynebacterium*.

En la presente invención, el microorganismo expresa el polipéptido que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa. Por ejemplo, puede ser un microorganismo que pertenece a los géneros *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacteria*, o *Salmonella*, preferentemente un microorganismo que pertenece a los géneros *Escherichia*, y más preferentemente, *E. coli*.

En los Ejemplos de la presente invención, se prepararon las cepas de *E. coli* CJM2 pCL_Pcj1_metAEL, CJM2 pCL_Pcj1_metAET y CJM2 pCL_Pcj1_metAEH transformadas con el vector recombinante que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido modificado de la presente invención (Ejemplo 2 y Ejemplo experimental 2), y las cepas de *E. coli* CJM2 pCL-Pcj1-metA(#11)EL, CJM2 pCL_Pcj1_metA(#11)ET y CJM2 pCL-Pcj1-metA(#11)EH transformadas con el vector recombinante que incluye el polinucleótido que codifica el polipéptido modificado resistente a la regulación de retroalimentación mediante metionina y que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa de la presente invención (Ejemplo 3 y Ejemplo experimental 2). Entre las cepas anteriores, las cepas CJM2 pCL_Pcj1_metA(#11)EL, CJM2 pCL_Pcj1_metA(#11)ET, y CJM2 pCL_Pcj1_metA(#11)EH se denominaron como CA05-0546, CA05-0547 y CA05-0548, respectivamente, y se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganism el 14 de diciembre de 2010, y se les asignó los números de acceso, KCCM11146P y KCCM11147P, respectivamente.

La presente invención proporciona el polipéptido modificado que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa, en el que una parte de las secuencias de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa se sustituyen. Por lo tanto, es ventajoso en que cuando el polipéptido modificado de la presente invención se expresa en el microorganismo que expresa el polipéptido que tiene solo actividad homoserina O-succiniltransferasa, el polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa se puede expresar sin la introducción de un gen extraño tal como metX que codifica la homoserina O-acetiltransferasa.

En la presente invención, el microorganismo anterior puede ser un microorganismo que está modificado adicionalmente para tener una actividad acetil-CoA sintetasa mejorada o modificado adicionalmente para tener actividad pantotenato cinasa resistente a la inhibición de retroalimentación mediante acumulación de CoA, con el fin de producir una gran cantidad de O-acetil homoserina.

En la presente invención, la acetil-CoA sintetasa y la pantotenato cinasa que son de diversos microorganismos, y los genes que codifican las proteínas que tienen estas actividades comúnmente se denominan acs y coaA, respectivamente.

En la presente invención, la mejora de la actividad acetil-CoA sintetasa se puede lograr a través de la mejora de la expresión génica por modificación de las secuencias de nucleótidos de la región del promotor y la región 5'-UTR del gen acs que codifica la acetil-CoA sintetasa, y la actividad de la proteína se puede mejorar mediante la introducción de la mutación en la región ORF del gen correspondiente, y el nivel de expresión de proteína se puede mejorar mediante la introducción de la copia adicional del correspondiente gen en el cromosoma, o mediante la introducción del correspondiente gen con el promotor propio u otro promotor mejorado en la cepa.

Más específicamente, la actividad acetil-CoA sintetasa se puede mejorar a través de la sustitución del promotor de actividad mejorada, la inducción de la mutación del promotor para la mejora de la actividad, o un aumento en el número de copias del gen, y por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para mejorar la productividad de O-acetil homoserina, y *E. coli* preparada mediante el procedimiento. Para la sustitución del promotor de actividad mejorada, pTac, pTrc, pPro, pR, y pL, que son conocidos por tener una actividad mejorada, se pueden usar.

De acuerdo con una realización preferida, la presente invención proporciona un a cepa productora de O-acetil homoserina, en la que el gen acs implicado en la biosíntesis de acetil-CoA se sobreexpresa mediante la sustitución de un promotor de expresión constitutiva, promotor pro, para su promotor. El promotor pro puede ser una parte o la totalidad de la SEQ ID NO: 30.

La presente invención proporciona adicionalmente un microorganismo que se introduce con una pantotenato cinasa modificada resistente a la inhibición de retroalimentación mediante la acumulación de CoA en las vías biosintéticas de CoA. Más específicamente, el aminoácido arginina en la posición 106 en la secuencia de aminoácidos de la pantotenato cinasa se sustituye por alanina (SEQ ID NO: 40) de manera que se vuelve resistente a la inhibición de retroalimentación mediante acumulación de CoA, lo que lleva a una mejora de la productividad de O-acetil homoserina.

5 En la presente invención, el microorganismo anterior puede ser un microorganismo, en el que el número de copias de uno o más genes seleccionados a partir del grupo que consiste en el gen que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc), el gen que codifica la aspartato aminotransferasa (aspC) y el gen que codifica la aspartato semialdehído deshidrogenasa (asd) es elevado, o el promotor del gen se sustituye por un promotor de mejora de actividad o se muta para tener una actividad mejorada.

En la presente invención, la serie de enzimas tiene las actividades de síntesis de O-acetil homoserina a partir de fosfoenolpiruvato, tal como se muestra en los siguientes Esquemas de reacción. Por lo tanto, la acumulación de O-acetil homoserina en las células se puede inducir potenciando la expresión de los genes que tienen estas actividades.

10 Fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc)

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{Oxaloacetato} + \text{Fosfato}$$

Aspartato aminotransferasa (aspC)

$$\text{Oxaloacetato} + \text{Glutamato} \leftrightarrow \text{Aspartato} + \text{a-cetoglutarato}$$

Aspartato cinasa (thrA)

$$\text{Aspartato} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{Aspartil-4-fosfato} + \text{ADP}$$

15 Aspartato semialdehído deshidrogenasa (asd)

$$\text{Aspartil-4-fosfato} + \text{NADPH} \leftrightarrow \text{Aspartato-semialdehído} + \text{Fosfato} + \text{NADP}^+$$

Homoserina deshidrogenasa (thrA)

$$\text{Aspartato-semialdehído} + \text{NADPH} \leftrightarrow \text{Homoserina}$$

20 En los esquemas de reacción, el gen thrA que codifica la enzima bifuncional, aspartato cinasa/homoserina deshidrogenasa se mejora previamente mediante la ayuda de la inhibición de la retroalimentación en la cepa CJM2 en el Ejemplo experimental 2, y las tres enzimas restantes se pueden mejorar mediante un aumento en el número de copias del gen, la sustitución del promotor del gen anterior por el promotor de mejora de actividad, o la inducción de una mutación del promotor para la mejora de la actividad.

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "aumento en el número de copias" se refiere a una introducción adicional de un gen deseado en el cromosoma o mediante la introducción de un plásmido que tiene el gen que codifica la enzima correspondiente.

30 En los Ejemplos de la presente invención, una cepa CJM2-AP se preparó mediante la delección del promotor de acs de una cepa CJM2 con metA y metB delecionados y la sustitución del promotor pro de la misma, y después se transformó para tener coaA resistente a la retroalimentación para preparar una cepa CJM2-AP/CO que tiene un elevado grupo de acetil-coA, seguido por la preparación de una cepa CJM3 que tiene dos copias de tres genes ppc, aspC y asd. A continuación, las cepas CJM3 con pCL_Pcj1_metA#11(EL), pCL_Pcj1_metA#11(EH) y pCL_Pcj1_metA#11(ET) introducidos se denominaron como CA05-0578, CA05-0579 y CA05-0580, respectivamente, y se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganism el 12 de diciembre de 2011, y se les asignó los
 35 números de acceso, KCCM11229P y KCCM11230P, respectivamente (Ejemplo experimental 2).

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir O-acetil homoserina, que comprende las etapas de cultivar el microorganismo que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido modificado o el microorganismo que se transforma con el vector recombinante enlazado de manera operativa al polinucleótido que codifica el polipéptido modificado, y obtener la O-acetil homoserina que se produce durante el
 40 cultivo anterior del microorganismo.

En la presente invención, la producción de O-acetil homoserina usando el microorganismo que expresa el polipéptido modificado se puede realizar con un medio y condiciones apropiadas conocidas en la materia. Es bien entendido por los expertos en la materia que el procedimiento de cultivo se puede ajustar fácilmente de acuerdo con la cepa seleccionada.

45 Los ejemplos del procedimiento de cultivo incluyen, pero sin limitación, cultivos por lotes, continuo y por lotes alimentado. El medio usado en el cultivo tiene que estar en las condiciones de cultivo para una cepa específica.

El medio usado en la presente invención puede incluir cualquier fuente de carbono de sacarosa, glucosa, glicerol y ácido acético o combinaciones de los mismos, y la fuente de nitrógeno a usar se ejemplifica mediante las fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, extracto de carne de vaca, extracto de malta, licor de
 50 maceración de maíz y harina de frijol y fuentes de nitrógeno inorgánico como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio o combinaciones de los mismos.

El medio puede incluir dihidrogeno fosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio y las correspondientes sales que contienen sodio como una fuente de fosfato. El medio también puede incluir una sal de metal tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, los aminoácidos, las vitaminas y los precursores apropiados también se pueden agregar. El medio o los precursores se pueden añadir al cultivo por tipo de lotes o por tipo continuo. El pH del cultivo se puede ajustar durante el cultivo mediante la adición de manera apropiada de un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido potásico, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico, y la generación de espumas se puede inhibir durante el cultivo usando un antiespumante tal como éster de poliglicol de ácidos grasos.

Con el fin de mantener las condiciones aeróbicas del cultivo, el oxígeno o el gas que contiene oxígeno se debe de inyectar en el cultivo. Con el fin de mantener las condiciones anaeróbicas y microaeróbicas, no se puede inyectar gas o se puede inyectar nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono. La temperatura del cultivo puede ser de 27 °C a 37 °C, y preferentemente 30 °C a 35 °C. El período de cultivo puede continuarse siempre que se produzca el material deseado, y preferentemente durante 10 a 100 horas.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los Ejemplos y Ejemplos experimentales. Sin embargo, estos Ejemplos son solo con fines ilustrativos, y la invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

Ejemplo 1: Construcción de plásmido que incluye homoserina O-succiniltransferasa y homoserina O-acetiltransferasa

Se realizó una PCR usando el cromosoma de la cepa W3110 de *E.coli* (N.º de acceso ATCC9637) adquirida de American Type Culture Collection como un molde y cebadores de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 para amplificar el gen *metA* que codifica la homoserina O-succiniltransferasa.

Los cebadores usados en la PCR se prepararon basándose en la secuencia del cromosoma de *E.coli* de NC_000913 registrado en NIH Gene Bank, y los cebadores de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 tienen los sitios de restricción *EcoRV* y *HindIII*, respectivamente.

```
<SEQ ID NO: 1>
5' AATTGATATCATGCCGATTCGTGTGCCGG 3'
<SEQ ID NO: 2>
5' AATTAAGCTTTTAATCCAGCGTTGGATTCATGTG 3'
```

La PCR se realizó usando el cromosoma de *Deinococcus radiodurans* como un molde y los cebadores de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4 para amplificar el gen *metX* que codifica la homoserina O-acetiltransferasa (SEQ ID NO: 44). Los cebadores de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4 tienen los sitios de restricción *EcoRV* y *HindIII*, respectivamente.

```
<SEQ ID NO: 3>
5' AATTGATATCATGACCGCCGTGCTCGC 3'
<SEQ ID NO: 4>
5' AATTAAGCTTTCAACTCCTGAGAAACGCCCC 3'
```

La PCR se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, 25 ciclos que consisten en la desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 5 minutos, y polimerización a 72 °C durante 7 minutos.

Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el plásmido pCL1920 que contiene el promotor *cj1* (KR 2006-0068505) tras el tratamiento con enzimas de restricción, *EcoRV* y *HindIII*, respectivamente. *E.coli* DH5 α se transformó con los plásmidos clonados, y la *E.coli* DH5 α transformada se seleccionó en placas LB que contienen 50 μ g/ml de espectinomicina para obtener plásmidos. Los plásmidos obtenidos se denominaron como pCL_Pcj1_*metA* y pCL_Pcj1_*metXdr*, respectivamente.

Ejemplo 2: Construcción de polipéptido modificado que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa

El aminoácido glicina (Gly) en la posición 111 de la O-succiniltransferasa se sustituyó por ácido glutámico (Glu) usando el plásmido pCL_Pcj1_*metA* preparado en el Ejemplo 1 como un molde y un kit de mutagénesis de sitio dirigido (Stratagene, Estados Unidos) (G111E). Las secuencias de los cebadores usados son como sigue:

```
<SEQ ID NO: 5>
5' ttgtaactggtgcgcccgtggaactggtgggttaatgatgctc 3'
<SEQ ID NO: 6>
5' gacatcattaaacccaccagttccagcgccaccagttacaa 3'
```

El plásmido construido que contiene el gen mutante G111R metA se denominó como pCL_Pcj1_metA(EL).

Además, el aminoácido glicina (Gly) en la posición 111 de O-succiniltransferasa se substituyó por ácido glutámico (Glu), y el aminoácido leucina en la posición 112 de O-succiniltransferasa se substituyó por treonina (L112T) o histidina (L112H). En este momento, las secuencias de los cebadores usados son como sigue:

5 Sustitución de treonina por leucina

<SEQ ID NO: 7>

5' tgaactggtgCGCCGCTGGAACCGTGGGGTTAATGATGTCG 3'

<SEQ ID NO: 8>

5' cgacatcattaaaccccacggttccagcggcgcaccagttaca 3'

Sustitución de histidina por leucina

<SEQ ID NO: 9>

5' tgaactggtgCGCCGCTGGAACATGTGGGGTTAATGATGTCG 3'

<SEQ ID NO: 10>

5' cgacatcattaaaccccacatgttccagcggcgcaccagttaca 3'

10 Entre los plásmidos construidos, el plásmido que contiene el gen metA, en el que el aminoácido glicina en la posición 111 se substituyó por ácido glutámico y el aminoácido leucina en la posición 112 se substituyó por treonina, se denominó como pCL_Pcj1_metA(ET). Asimismo, el plásmido que contiene el gen metA, en el que el aminoácido glicina en la posición 111 se substituyó por ácido glutámico y el aminoácido leucina en la posición 112 se substituyó por histidina, se denominó como pCL_Pcj1_metA(EH).

15 **Ejemplo 3: Construcción de polipéptido modificado resistente a la retroalimentación que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa**

20 El gen metA que tiene un resistencia a la regulación de retroalimentación mediante metionina (metA #11) se construyó usando el plásmido pCL_Pcj1_metA preparado en el Ejemplo 1 como un molde del mismo modo que en el Ejemplo 2. Específicamente, de acuerdo con el procedimiento desvelado en la Publicación de PCT N.º WO 2008/127240, serina, ácido glutámico y fenilalanina en la posición 29, 114 y 140 de la O-succiniltransferasa se substituyeron por prolina (S29P), glicina (E114G), y serina (F140S), respectivamente. Las secuencias de los cebadores usados son como sigue.

Sustitución de prolina por serina

<SEQ ID NO: 11>

5' ATGACAACCTTCTCGTGCGCCTGGTCAGGAAATTCG 3'

<SEQ ID NO: 12>

5' CGAATTCCTGACCAGGCGCACGAGAAGTTGTCAT 3'

Sustitución de glicina por ácido glutámico

<SEQ ID NO: 13>

5' CGCCGCTGGGCCTGGTGGGGTTAATGATGTCGCT 3'

<SEQ ID NO: 14>

25 5' AGCGACATCATTAAACCCACCAGGCCAGCGGCG 3'

Sustitución de serina por fenilalanina

<SEQ ID NO: 15>

5' CACGTCACCTCGACGCTGAGTGTCTGCTGGGCGGT 3'

<SEQ ID NO: 16>

5' ACCGCCAGCAGACACTCAGCGTCGAGGTGACGTG 3'

Cada una de las mutaciones se introdujo de manera secuencial para construir un plásmido que contiene el gen metA(#11) con las tres mutaciones, que se denominó como pCL_Pcj1_metA#11.

30 Posteriormente, se construyeron plásmidos para expresar polipéptidos que tienen mutaciones idénticas a las de los polipéptidos modificados que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa del Ejemplo 2 usando el plásmido preparado pCL_Pcj1_metA#11 como un molde.

Entre los plásmidos construidos, el plásmido que contiene el gen *metA* #11, en el que el aminoácido glicina en la posición 111 se sustituyó por ácido glutámico, se denominó como pCL_Pcj1_metA#11(EL), el plásmido que contiene el gen *metA* #11, en el que el aminoácido glicina en la posición 111 se sustituyó por ácido glutámico y el aminoácido leucina en la posición 112 se sustituyó por treonina, se denominó como pCL_Pcj1_metA#11(ET), y el plásmido que contiene el gen *metA* #11, en el que el aminoácido glicina en la posición 111 se sustituyó por ácido glutámico y el aminoácido leucina en la posición 112 se sustituyó por histidina, se denominó como pCL_Pcj1_metA#11(EH).

Ejemplo experimental 1: Comparación de homología entre la homoserina succiniltransferasa de *E.coli* y la homoserina succiniltransferasa resistente a retroalimentación de *E.coli*

Las secuencias primarias de aminoácidos [SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, y SEQ ID NO: 43 en orden] de las variantes de homoserina O-succiniltransferasa de *E. coli* O9:H4 (cepa HS), *E. coli* 0139: H28 (cepa E24377A), y *E. coli* 0157:H7 (cepa ATCC8739) se compararon usando el programa CLC Main Workbench (CLC bio, Dinamarca).

Tal como se muestra en la FIG. 2, se observaron variaciones de menos del 5 % en las secuencias primarias de aminoácidos de homoserina O-succiniltransferasa de las variantes de *E.coli* (FIG. 2).

Las secuencias primarias de aminoácidos de la homoserina O-succiniltransferasa mutante resistente a la regulación de retroalimentación mediante metionina también se compararon usando el programa anterior. Para la comparación, se usaron las secuencias primarias de aminoácidos de la homoserina O-succiniltransferasa de tipo silvestre, el mutante *met10A* y el *met11A* de homoserina O-succiniltransferasa resistente a la regulación de retroalimentación desvelados en la Publicación de PCT N.º WO 2008/127240, y el mutante de homoserina O-succiniltransferasa resistente a la regulación de retroalimentación desvelado en la Publicación de PCT N.º WO 2005/108561.

Tal como se muestra en las FIG. 3 y 4, se observaron variaciones de menos del 5 % en las secuencias primarias de aminoácidos del mutante homoserina O-succiniltransferasa resistente a la regulación de retroalimentación mediante metionina (las FIG. 3 y 4).

Estos resultados indican que los polipéptidos de homoserina O-succiniltransferasa presentes en *E.coli* tenían el 95 % o más entre ellos, y no hubo gran diferencia en la actividad homoserina succiniltransferasa aún con menos del 5 % de diferencia de secuencia.

Ejemplo experimental 2: Comparación de especificidad por el substrato y actividad entre los polipéptidos modificados que tienen actividad homoserina acetiltransferasa

2-1: Preparación de cepas de ensayo

2-1-1) Deleción de genes *metA* y *metB*

Con el fin de comparar actividades de polipéptidos modificados que producen cantidades excesivas de O-acetil homoserina, se preparó una cepa que acumula homoserina y que tiene una deleción de la utilización de O-acetil homoserina. La cepa con los genes *metA* y *metB* delecionados se preparó mediante los procedimientos de los Ejemplos 1-1 a 1-4 descritos en la Publicación de Patente EP2108693A2, basándose en la cepa productora de treonina, FTR2533 (KCCM 10541) descrita en el documento PCT/KR2005/00344. La cepa se denominó como CJM2. CJM2 es una cepa que acumula una gran cantidad de homoserina y produce O-acetil homoserina o O-succinil homoserina dependiendo del gen introducido.

2-1-2) Sustitución del promotor *acs*

Para la producción de una cantidad excesiva de O-acetil homoserina, se debe facilitar la producción de homoserina y acetil-CoA. En primer lugar, para facilitar el suministro de acetil-coA, se sustituyó el promotor del gen *acs* (acetil-coA sintetasa) por el promotor pro constitutivo de la SEQ ID NO: 30 para inducir la sobreexpresión constitutiva del gen deseado. Para la sustitución del promotor, se realizó una PCR FRT de una etapa modificada (PNAS (2000) vol.97: 6640-6645). Con el fin de preparar un casete tal como se muestra en la FIG. 5, un casete de FRT de resistencia a cloranfenicol derivado de pKD3 (PNAS (2000) vol.97: 6640-6645) se sometió a PCR usando la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 33, y la región del promotor pro se sometió a PCR usando la SEQ ID NO: 32 y la SEQ ID NO: 34. Dos productos de PCR se sometieron a PCR de solapamiento para preparar un único casete (casete con promotor *acs* delecionado-promotor pro sustituido) (Nucleic Acids Res. 11 de agosto de 1988; 16(15): 7351-7367). La PCR se realizó en las siguientes condiciones: 30 ciclos que consisten en la desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 1 minuto.

<SEQ ID NO: 31>

5'

AGGGGCTTCATCCGAATTGCGCCATTGTTGCAATGGCGGTGCTGGAGCTGCTTCGAAGTT

C 3'

<SEQ ID NO: 32>

5' GATATTCATATGGACCATGGCTCGAGCATAGCATTTTTATCC 3'

<SEQ ID NO: 33>

5' GGATAAAAATGCTATGCTCGAGCCATGGTCCATATGAATATC 3'

<SEQ ID NO: 34>

5'

CGATGTTGGCAGGAATGGTGTGTTTGTGAATTTGGCTCATATGTACCTTTCTCCTCTTTA

3'

5 El producto resultante de la PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 %, y después se purificó el ADN a partir de una banda de aproximadamente 1,2 kpb. El ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa CJM2 transformada anteriormente con un vector pKD46 (PNAS (2000) vol.97: 6640-6645). Antes de la electroporación, la cepa CJM2 transformada con pKD46 se cultivó a 30 °C en medio LB que contiene 100 µg/l de ampicilina y 5 mM de L-arabinosa hasta que la DO600 alcanzó 0,6. Después, la cepa cultivada se lavó una vez con agua destilada esterilizada y dos veces con glicerol al 10 %. La electroporación se realizó a 2500 V. La cepa recuperada se cultivó en estrías en una placa de medio LB que contiene 25 µg/l de cloranfenicol, seguido por el cultivo a 37 °C durante toda la noche. Después, se seleccionó en consecuencia una cepa que presentaba resistencia al cloranfenicol.

15 La PCR se realizó usando la cepa seleccionada como un molde y los mismos cebadores en las mismas condiciones. La delección del promotor *acs* y la sustitución del promotor *pro* se identificaron confirmando el gen de 1,2 kb de tamaño en gel de agarosa al 1,0 %. La cepa se transformó entonces con el vector pCP20 (PNAS (2000) vol.97: 6640-6645) y se cultivó en medio LB. Se construyó la cepa final con el promotor *acs* deleccionado y el promotor *pro* sustituido en la que el tamaño del gen se redujo a 150 pb sobre gel de agarosa al 1,0 % mediante PCR en las mismas condiciones experimentales, y se confirmó que el gen del marcador de cloranfenicol estaba deleccionado. La cepa construida se denominó como CJM2-AP.

2-1-3) Sustitución de *coaA* resistente a la retroalimentación

20 Con el fin de preparar la cepa CJM2-AP que tiene *coaA* resistente a la retroalimentación, la PCR se realizó usando el ADN *w3110* como un molde y los cebadores de la SEQ ID NO: 35 y la SEQ ID NO: 36 que contiene el sitio de restricción *EcoRI* para obtener un gen *coaA* que codifica la pantotenato cinasa. La ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra™ (Stratagene) se usó como polimerasa, y se realizó la PCR en las condiciones de 30 ciclos que consisten en la desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos; la hibridación a 50 °C durante 30 segundos; y la polimerización a 72 °C durante 2 minutos.

25 Tras el tratamiento del gen *coaA* obtenido y el plásmido pSG76C (Journal of Bacteriology, Julio de 1997, 4426-4428) con la enzima de restricción *EcoRI*, se unieron entre sí. *E.coli* DH5α se transformó con el plásmido construido, y entonces la *E.coli* DH5α transformada se seleccionó en placas de medio LB que contienen 25 µg/ml de cloranfenicol para obtener pSG-76C-*coaA*.

<SEQ ID NO: 35>

5' ATGAGTATAAAAAGAGCAAAC 3'

<SEQ ID NO: 36>

30 5' TTATTTGCGTAGTCTGACC 3'

El pSG-76C-*coaA* (R106A) se construyó usando el pSG-76C-*coaA* obtenido y los cebadores de la SEQ ID NO: 37 y la SEQ ID NO: 38 mediante mutagénesis de sitio dirigido (Stratagene, Estados Unidos).

<SEQ ID NO: 37>

5' GGAAAAGTACAACCGCCgccGTATTGCAGGCGCTATT 3'

<SEQ ID NO: 38>

5' AATAGCGCCTGCAATACggcGGCGGTTGTACTTTTCC 3'

5 La cepa CJM2-AP se transformó con el plásmido pSG76c-coaA (R106A) y se cultivó en medio LB-Cm (10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 10 g/l de Triptona, 25 g/l de cloranfenicol) para seleccionar las colonias resistentes al cloranfenicol. El transformante seleccionado es una cepa en la que pSG76c-coaA (R106A) se inserta principalmente en la región coaA del genoma.

10 La cepa con el gen coaA (R106A) insertado se transformó con un vector pASceP (Journal of Bacteriology, Julio de 1997, 4426-4428) que expresa la enzima de restricción I-SceI que escinde el sitio I-SceI presente en pSG76c, seguido por la selección de cepas en LB-Ap (10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 10 g/l de Triptona, 100 µg/l de ampicilina). El gen coaA se amplificó a partir de la cepa seleccionada usando los cebadores de la SEQ ID NO: 35 y la SEQ ID NO: 36, y la sustitución de coaA (R106) en el gen amplificado se confirmó mediante el servicio de secuenciación de MacroGen (Corea) (Nucleic Acids Research, 1999, Vol.27, N.º 22 4409-4415). La cepa preparada se denominó como CJM2-AP/CO. La cepa CJM2-AP/CO es una cepa que tiene una cantidad elevada de homoserina y acetil-coA.

2-1-4) Aumento en el número de copias de los genes clave en las vías biosintéticas de homoserina

15 Aunque la cepa CJM2 o CJM2-AP/CO es una cepa que produce una cantidad excesiva de homoserina, el número de copias de los tres genes de ppc, aspC y asd se elevaron para mejorar más la productividad de homoserina. Los plásmidos pSG76c-2ppc, pSG76c-2aspC y pSG76c-2asd se construyeron mediante los procedimientos descritos en los Ejemplos <1-1> a <1-3> de la Publicación de Patente N.º KR2011-0023703 y los plásmidos se introdujeron en la cepa CJM2-AP/CO para preparar una cepa que tuviese dos copias de los tres genes mediante el procedimiento del Ejemplo <1-5>. La cepa preparada se denominó como CJM3. CJM3 es una cepa que acumula una gran cantidad de homoserina comparada con la cepa CJM2, y produce O-acetil homoserina u O-succinil homoserina dependiendo del plásmido introducido.

2-2: Procedimientos experimentales y resultados experimentales

25 Se prepararon dos cepas de CJM2 y CJM3 como células competentes, y 9 plásmidos de pCL_Pcj1_metX, pCL_Pcj1_metA, pCL_Pcj1_metA(EL), pCL_Pcj1_metA(EH), pCL_Pcj1_metA(ET), pCL-Pcj1-metA#11, pCL_Pcj1_metA#11(EL), pCL_Pcj1_metA#11(EH), y pCL-Pcj1-metA#11(ET) se introdujeron en las células competentes mediante electroporación, respectivamente.

30 Entre ellos, las cepas CJM2 a las que se les introdujo pCL_Pcj1_metA#11(EL), pCL_Pcj1_metA#11(EH), y pCL_Pcj1_metA#11(ET) se denominaron CA05-0546, CA05-0547 y CA05-0548, respectivamente. Se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganism el 14 de diciembre de 2010, y se les asignó los números de acceso, KCCM11145P, KCCM11146P y KCCM11147P, respectivamente.

35 Además, las cepas CJM3 a las que se les introdujo pCL_Pcj1_metA#11(EL), pCL_Pcj1_metA#11(EH), y pCL_Pcj1_metA#11(ET) se denominaron CA05-0578, CA05-0579 y CA05-0580, respectivamente. Se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganism el 12 de diciembre de 2011, y se les asignó los números de acceso, KCCM11228P, KCCM11229P y KCCM11230P, respectivamente.

40 A continuación, se realizó un ensayo de matraz para comparar los tipos y productividades de los precursores de metionina que se produjeron en cada una de las cepas a las que se les introdujo los 9 tipos de plásmidos. En el ensayo de matraz, tras sembrar en estrías cada cepa en placas de LB y cultivarlas en una incubadora a 31 °C durante 16 horas, se inocularon colonias únicas en 3 ml de medio LB, y después se cultivaron en una incubadora a 200 rpm/31 °C durante 16 horas.

45 Se pusieron 25 ml del medio de producción del precursor de metionina de la Tabla 1 en matraces de 250 ml, y se añadieron a cada una de ellas 500 µl de los caldos de cultivo. Después, se incubaron los matraces en una incubadora de 200 rpm/31 °C durante 40 horas, y el tipo y la productividad del precursor de metionina producido por cada una de las cepas a las que se les ha introducido el plásmido se compararon mediante HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 2 (resultados de las cepas de tipo CJM2) y en la Tabla 3 (resultados de las cepas de tipo CJM3).

[Tabla 1]

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	70 g
Sulfato de amonio	25 g

(continuación)

Composición	Concentración (por litro)
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·8H ₂ O	5 mg
ZnSO ₄	5 mg
Carbonato de calcio	30 g
Extracto de levadura	2 g
Metionina	0,3 g
Treonina	1,5 g

[Tabla 2]

Cepas	DO	Consumo de azúcar (g/l)	Producto (g/l)	Cantidad de producción (g/l)
CJM2 pCL_Pcj1_metX	35,6	63,8	O-acetil homoserina	12,3
CJM2 pCL_Pcj1_metA(ts)	31,3	49,1	O-succinil homoserina	2,7
CJM2 pCL_Pcj1_metA EL	32,6	48,3	O-acetil homoserina	2,5
CJM2 pCL_Pcj1_metA ET	33,6	50,2	O-acetil homoserina	2,0
CJM2 pCL_Pcj1_metA EH	31,9	47,5	O-acetil homoserina	3,1
CJM2 pCL_Pcj1_metA(#11)	29,5	56,2	O-succinil homoserina	11,3
CJM2 pCL_Pcj1_metA(#11)EL	32,7	49,0	O-acetil homoserina	7,8
CJM2 pCL_Pcj1_metA(#11)ET	38	53,7	O-acetil homoserina	6
CJM2 pCL_Pcj1_metA(#11)EH	34,5	59,1	O-acetil homoserina	11,1

[Tabla 3]

Cepas	DO	Consumo de azúcar (g/l)	Producto (g/l)	Cantidad de producción (g/l)
CJM3 pCL_Pcj1_metX	17,2	67,0	O-acetil homoserina	23,7
CJM3 pCL_Pcj1_metA(ts)	18,8	60,5	O-succinil homoserina	1,2
CJM3 pCL_Pcj1_metA EL	18,5	60,5	O-acetil homoserina	2,1
CJM3 pCL_Pcj1_metA ET	18,0	61,0	O-acetil homoserina	2,2
CJM3 pCL_Pcj1_metA EH	17,8	62,2	O-acetil homoserina	3,2
CJM3 pCL_Pcj1_metA(#11)	14,6	67,0	O-succinil homoserina	16,1
CJM3 pCL_Pcj1_metA(#11)EL	17,1	63,2	O-acetil homoserina	12,5
CJM3 pCL_Pcj1_metA(#11)ET	18,2	65,1	O-acetil homoserina	16,7
CJM3 pCL_Pcj1_metA(#11)EH	19,0	67,8	O-acetil homoserina	24,8

5 Como muestran las Tablas 2 y 3, solo se produjo O-succinil homoserina mediante el pCL_Pcj1_metA(ts) que incluye el gen metA de tipo silvestre, pero solo se acumuló O-acetil homoserina por las cepas que incluyen los tres genes metA mutados de la presente invención. Es decir, la actividad homoserina succiniltransferasa del polipéptido se modificó a la actividad homoserina acetiltransferasa mediante la sustitución de sus aminoácidos.

10 Además, entre los tres mutantes de la cepa de tipo CJM3, la cepa (EL) preparada mediante la sustitución de ácido glutámico por el aminoácido en la posición 111 produjo 2,1 g/l de O-acetil homoserina, mientras que la cepa (EH) preparada mediante la sustitución adicional de histidina por el aminoácido en la posición 112 produjo 3,2 g/l de O-acetil homoserina, que es la productividad más alta de O-acetil homoserina.

15 Las cepas que expresan los polipéptidos modificados que tienen actividad homoserina acetiltransferasa resistente a la regulación de retroalimentación mediante metionina también presentaron los mismos resultados. Específicamente, la cepa a la que se le introdujo el gen metA #11(EH), que tenía una resistencia a la regulación de retroalimentación mediante metionina y sustituciones de ácido glutámico e histidina por los aminoácidos en las posiciones 111 y 112, produjo la cantidad más grande de O-acetil homoserina (24,8 g/l), lo que indica que acumula O-acetil homoserina a

un nivel similar al de la que se le introdujo el gen extraño de homoserina acetiltransferasa (CJM3 pCL_Pcj1_metX, 23,7 g/l).

Efecto de la invención

5 De acuerdo con la presente invención, la O-acetil homoserina se puede producir a partir de homoserina sin la introducción de un gen extraño en un microorganismo que expresa una enzima que convierte la homoserina en O-succinil homoserina, y la anterior O-acetil homoserina se puede usar como un precursor para la producción de metionina. Por lo tanto, cuando la presente invención se aplica a la producción de metionina para su uso en alimentos, es ventajosa en que los problemas de ansiedad y las actitudes negativas de los consumidores hacia la introducción de genes extraños y la provisión de pruebas de seguridad para la introducción de genes extraños se puede solucionar.

<110> CJ **CHEILJEDANG** Corporation

<120> Mutante que tiene actividad homoserina O-acetil transferasa y microorganismo que lo expresa

<130> OPA11205/PCT

<150> KR10-2010-0131953

15 <151> 21/12/2010

<150> KR10-2011-0139228

<151> 21/12/2011

<160> 44

<170> KopatentIn 2.0

20 <210> 1

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> cebador directo

<400> 1

aattgatatc atgccgattc gttgcccgg 29

<210> 2

<211> 34

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador inverso

<400> 2

35 aattaagctt ttaatccagc gttggattca tgtg 34

<210> 3

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> cebador directo

<400> 3

aattgatatc atgaccgccc tgctcgc 27

45 <210> 4

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador inverso

ES 2 650 451 T3

<400> 4
 aattaagctt tcaactctg agaaacgccc c 31

 <210> 5
 <211> 35
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo

 <400> 5
 10 atgacaactt ctcgtgcgcc tggcaggaa attcg 35

 <210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 6
 cgaatttctt gaccaggcgc acgagaagtt gtcat 35

 <210> 7
 20 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo

 25 <400> 7
 cgccgctggg cctggtgggg ttaatgatg tcgct 35

 <210> 8
 <211> 35
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 8
 agcgacatca ttaaacccca ccaggcccag cggcg 35

 35 <210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> cebador directo

 <400> 9
 cacgtcacct cgacgctgag tgtctgctgg gcggt 35

 <210> 10
 <211> 35
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 10
 50 accgccagc agacactcag cgctgagggtg acgtg 35

ES 2 650 451 T3

<210> 11
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador directo

<400> 11
ttgtaactgg tgcgccgctg gaactggtgg ggttaatga tgtc 44

10 <210> 12
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso

15 <400> 12
gacatcatta aaccccacca gttccagcgg cgcaccagtt acaa 44

<210> 13
<211> 44
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo

<400> 13
tgtaactggt gcgccgctgg aaaccgtggg gtttaatgat gtcg 44

25 <210> 14
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> cebador inverso

<400> 14
cgacatcatt aaaccccacg gtttccagcg gcgcaccagt taca 44

<210> 15
<211> 44
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo

<400> 15
40 tgtaactggt gcgccgctgg aacatgtggg gtttaatgat gtcg 44

<210> 16
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> cebador inverso

<400> 16
cgacatcatt aaaccccaca tgttccagcg gcgcaccagt taca 44

<210> 17
50 <211> 309
<212> PRT

ES 2 650 451 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de MetA que tiene actividad homoserina O-succinil transferasa

<400> 17

```
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
```

5

ES 2 650 451 T3

					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														

<210> 18

<211> 309

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante del polipéptido que tiene actividad homoserina O-succinil transferasa, metA EL

<400> 18

ES 2 650 451 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 Glu 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

ES 2 650 451 T3

- 5
- <210> 19
 - <211> 309
 - <212> PRT
 - <213> Secuencia artificial

 - <220>
 - <223> Variante del polipéptido que tiene actividad homoserina O-succinil transferasa, metA ET

 - <400> 19

ES 2 650 451 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 Glu Thr
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

ES 2 650 451 T3

- 5
- <210> 20
 - <211> 309
 - <212> PRT
 - <213> Secuencia artificial

 - <220>
 - <223> Variante del polipéptido que tiene actividad homoserina O-succinil transferasa, metA EH

 - <400> 20

ES 2 650 451 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 Glu His
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

ES 2 650 451 T3

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

- <210> 21
- <211> 309
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Variante de resistencia a la retroalimentación del polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetil transferasa, met11A EL

- 10 <400> 21

ES 2 650 451 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 Pro 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 Glu Thr Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Glu Leu
100 105 110

Val Gly 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 Pro 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

ES 2 650 451 T3

5 <210> 22
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante de resistencia a la retroalimentación del polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetil transferasa, met11A ET

<400> 22

```

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 Pro 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 Glu Thr Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Glu Thr
           100          105          110

Val Gly 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 Pro 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
  
```

10

ES 2 650 451 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 Pro 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 Glu Thr Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Glu His
100 105 110

Val Gly 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 Pro 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

ES 2 650 451 T3

5	<p><210> 24 <211> 930 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> polinucleótido que codifica la variante del polipéptido, metAEL</p> <p><400> 24</p>	
	<p>atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcggtga agaaaacgtc</p>	60
	<p>tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc</p>	120
	<p>cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac</p>	180
	<p>tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg</p>	240
	<p>cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt</p>	300
	<p>gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg gaactgggtg agtttaatga tgtcgcttac</p>	360
	<p>tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt</p>	420
	<p>gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc</p>	480
	<p>accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg</p>	540
	<p>cgtaggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg</p>	600
	<p>ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat</p>	660
	<p>ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg</p>	720
	<p>caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg</p>	780
	<p>tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac</p>	840
	<p>ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat</p>	900
	<p>ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa</p>	930
10	<p><210> 25 <211> 930 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> polinucleótido que codifica la variante del polipéptido, metAET</p> <p><400> 25</p>	

ES 2 650 451 T3

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc	60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc	120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgcct gctttcaaac	180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg	240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt	300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg gaaaccgtgg agtttaatga tgtcgcttac	360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt	420
gtctgctggg cggtagaggc cgcgctcaat 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
ctgtttgccg 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 tgaatccaac gctggattaa	930

<210> 26

<211> 930

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polinucleótido que codifica la variante del polipéptido, metAEH

<400> 26

5

ES 2 650 451 T3

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc 60
 tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc 120
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgctcct gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg gaacatgtgg agtttaatga tgtcgcttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420
 gtctgctggg cggtagcaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggagaagg ggatgcatat 660
 ctgtttgcc a gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgog 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg 780
 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat 900
 ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa 930

<210> 27

<211> 930

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polinucleótido que codifica la variante del polipéptido, met11AEL

<400> 27

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc 60
 tttgtgatga caacttctcg tgcgcctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc 120
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgctcct gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg gaactggtgg ggtttaatga tgtcgcttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtct 420

5

10

ES 2 650 451 T3

gtctgctggg cggtagagc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggccttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660
 ctgtttgcc a gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg 780
 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttacaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat 900
 ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa 930

<210> 28

<211> 930

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polinucleótido que codifica la variante del polipéptido, met11AET

<400> 28

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccg gccgtcaatt tcttgcgtga agaaaacgtc 60
 tttgtgatga caacttctcg tgcgcctggg caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc 120
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcccct gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacatgatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg gaaaccgtgg ggtttaatga tgcgcttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtct 420
 gtctgctggg cggtagagc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggccttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660
 ctgtttgcc a gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg 780
 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttacaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat 900
 ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa 930

5

10

ES 2 650 451 T3

5 <210> 29
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polinucleótido que codifica la variante del polipéptido, met11AEH

<400> 29

```

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 gaacatgtgg ggtttaatga tgcgcttac      360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtct      420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaatt ctggcagaga cggagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagacc ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac      840
ggtaatttac tgttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa      930
  
```

10 <210> 30
 <211> 134
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> nucleótido del promotor pro

<400> 30

```

tcgagcatag ctttttctc cataagatta gcggatctaa cttttacaat tgtgagcgt      60
cacaattatg atagattcaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacagaat tcattaaaga      120
ggagaaaggc acat      134
  
```

ES 2 650 451 T3

<210> 31
 <211> 61
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 31

 aggggcttca tccgaattgc gccattgttg caatggcggg gctggagctg cttcgaagtt 60

 c 61

 10 <210> 32
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> cebador

 <400> 32
 gatattcata tggacatgg ctcgagcata gcattttat cc 42

 <210> 33
 <211> 42
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 33
 25 ggataaaaat gctatgctcg agccatggtc catatgaata tc 42

 <210> 34
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> cebador

 <400> 34

 cgatgttggc aggaatggtg tgtttgtgaa tttggctcat atgtaccttt ctcctcttta 60

 60

 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo

 <400> 35
 40 atgagtataa aagagcaaac 20

 <210> 36
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>

ES 2 650 451 T3

```

<223> cebador inverso
<400> 36
ttatttgcgt agtctgacc    19

<210> 37
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo
10 <400> 37
ggaaaagtac aaccgccgcc gtattgcagg cgctatt    37

<210> 38
<211> 37
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso

<400> 38
aatagcgct gcaatacggc ggcggttga ctttcc37

20 <210> 39
<211> 930
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> metA

<400> 39
atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgtga agaaaacgtc    60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc    120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac    180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacatcgatt cccgtgaatc gcgcaacacg    240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt    300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgtcgcttac    360

```

ES 2 650 451 T3

tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt	420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat 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
ctgtttgcc gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg	720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg	780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac	840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat	900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa	930

<210> 40

<211> 316

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> coaA resistente a la retroalimentación, coaA R106A

<400> 40

ES 2 650 451 T3

Met Ser Ile Lys Glu Gln Thr Leu Met Thr Pro Tyr Leu Gln Phe Asp
1 5 10 15

Arg Asn Gln Trp Ala Ala Leu Arg Asp Ser Val Pro Met Thr Leu Ser
20 25 30

Glu Asp Glu Ile Ala Arg Leu Lys Gly Ile Asn Glu Asp Leu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Val Ala Glu Ile Tyr Leu Pro Leu Ser Arg Leu Leu Asn Phe
50 55 60

Tyr Ile Ser Ser Asn Leu Arg Arg Gln Ala Val Leu Glu Gln Phe Leu
65 70 75 80

Gly Thr Asn Gly Gln Arg Ile Pro Tyr Ile Ile Ser Ile Ala Gly Ser
85 90 95

Val Ala Val Gly Lys Ser Thr Thr Ala Arg Val Leu Gln Ala Leu Leu
100 105 110

Ser Arg Trp Pro Glu His Arg Arg Val Glu Leu Ile Thr Thr Asp Gly
115 120 125

Phe Leu His Pro Asn Gln Val Leu Lys Glu Arg Gly Leu Met Lys Lys
130 135 140

Lys Gly Phe Pro Glu Ser Tyr Asp Met His Arg Leu Val Lys Phe Val
145 150 155 160

Ser Asp Leu Lys Ser Gly Val Pro Asn Val Thr Ala Pro Val Tyr Ser
165 170 175

His Leu Ile Tyr Asp Val Ile Pro Asp Gly Asp Lys Thr Val Val Gln
180 185 190

Pro Asp Ile Leu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Val Leu Gln Ser Gly Met
195 200 205

Asp Tyr Pro His Asp Pro His His Val Phe Val Ser Asp Phe Val Asp
210 215 220

Phe Ser Ile Tyr Val Asp Ala Pro Glu Asp Leu Leu Gln Thr Trp Tyr
225 230 235 240

Ile Asn Arg Phe Leu Lys Phe Arg Glu Gly Ala Phe Thr Asp Pro Asp
245 250 255

Ser Tyr Phe His Asn Tyr Ala Lys Leu Thr Lys Glu Glu Ala Ile Lys
260 265 270

Thr Ala Met Thr Leu Trp Lys Glu Ile Asn Trp Leu Asn Leu Lys Gln
275 280 285

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

Ala Asn His Ala Val Glu Glu Val Arg Leu Arg Lys
305 310 315

ES 2 650 451 T3

5 <210> 41
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ECOHS, E. coli O9:H4 (cepa HS)
 <400> 41

```

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
 1           5           10
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
Glu 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
  
```

ES 2 650 451 T3

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

5

- <210> 42
- <211> 309
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> ECO24, E. coli O139: H28(cepa E24377A)
- <400> 42

ES 2 650 451 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

Glu 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 Asp 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 Tyr Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Gly
245 250 255

Pro Glu 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

ES 2 650 451 T3

<210> 43
<211> 309
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> ECO57, E. coli O157:H7, E. coli(cepa ATCC8739)

<400> 43

```
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
```

ES 2 650 451 T3

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

<210> 44
 <211> 2464
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> metX de Deinococcus radiodurans

<400> 44

ES 2 650 451 T3

atgcgagtgt tgaagttcgg cggtagatca gtggcaaatg cagaacgttt tctgcgtggt 60
 gccgatattc tggaaagcaa tgccaggcag gggcaggtgg ccaccgtcct ctctgcccc 120
 gccaaaatca ccaaccacct ggtggcgatg attgaaaaaa ccattagcgg ccaggatgct 180
 ttaccaata tcagcgatgc cgaacgtatt tttgccgaac ttttgacggg actcgccgcc 240
 gccagccggg gggtcccgtt 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
 ctggaatcta ccgtcgatat tgctgagtcc acccgccgta ttgcccgaag ccgcattccg 540
 gctgatcaca tgggtgctgat ggcaggtttc accgcccgta atgaaaaagg cgaactggtg 600
 gtgcttggac gcaacggttc cgactactct gctgcggtgc tggctgcctg tttacgcgcc 660
 gattgttgcg agatttggac ggacgttgac ggggtctata cctgcgaccc gcgtcaggtg 720
 cccgatgcga gggtgttgaa gtcgatgtcc taccaggaag cgatggagct ttctacttc 780
 ggcgctaaag ttcttcaccc ccgcaccatt acccccatcg ccagttcca gatcccttgc 840
 ctgattaata ataccgaaa tcctcaagca ccaggtacgc tcattggtgc cagccgtgat 900
 gaagacgaat taccggtcaa gggcatttcc aatctgaata acatggcaat gttcagcgtt 960
 tctgggtccg ggatgaaagg gatggtcggc atggcggcgc gcgtctttgc agcgatgtca 1020
 cgcgcccgta ttttcgtggt gctgattacg caatcatctt ccgaatacag catcagtttc 1080
 tgcgttccac aaagcgactg tgtgcgagct gaacgggcaa tgcaggaaga gttctacctg 1140
 gaactgaaag aaggcttact ggagccgctg gcagtgcgag aacggctggc cattatctcg 1200
 gtggtaggtg atggtatgcg caccttgcgt gggatctcgg cgaaattctt tgccgcactg 1260
 gcccgcgcca atatcaacat tgtcgccatt gctcagggat cttctgaacg ctcaatctct 1320
 gtcgtggtaa ataacgatga tgcgaccact ggcgtgcgcg ttactcatca gatgctgttc 1380
 aataccgatc aggttatcga agtggtttgtg attggcgtcg gtggcgttgg cgggtgcgctg 1440
 ctggagcaac tgaagcgtca gcaaagctgg ctgaagaata aacatatcga cttacgtgtc 1500
 tgcggtggtg ccaactcgaa ggctctgctc accaatgtac atggccttaa tctggaaaac 1560
 tggcaggaag aactggcgca agccaaagag ccgtttaatc tcgggcgctt aattcgctc 1620
 gtgaaagaat atcatctgct gaaccggctc attgttgact gcacttccag ccaggcagtg 1680
 gcggatcaat atgccgactt cctgcgcaaa ggtttccacg ttgtcacgcc gaacaaaag 1740
 gccaacacct cgtcgatgga ttactacat cagttgcgtt atgcccggga aaaatcgcg 1800
 cgtaaatcc tctatgacac caacgttggg gctggattac cggttattga gaacctgcaa 1860
 aatctgctca atgcaggtga tgaattgatg aagttctccg gcattcttct tggttcgctt 1920

ES 2 650 451 T3

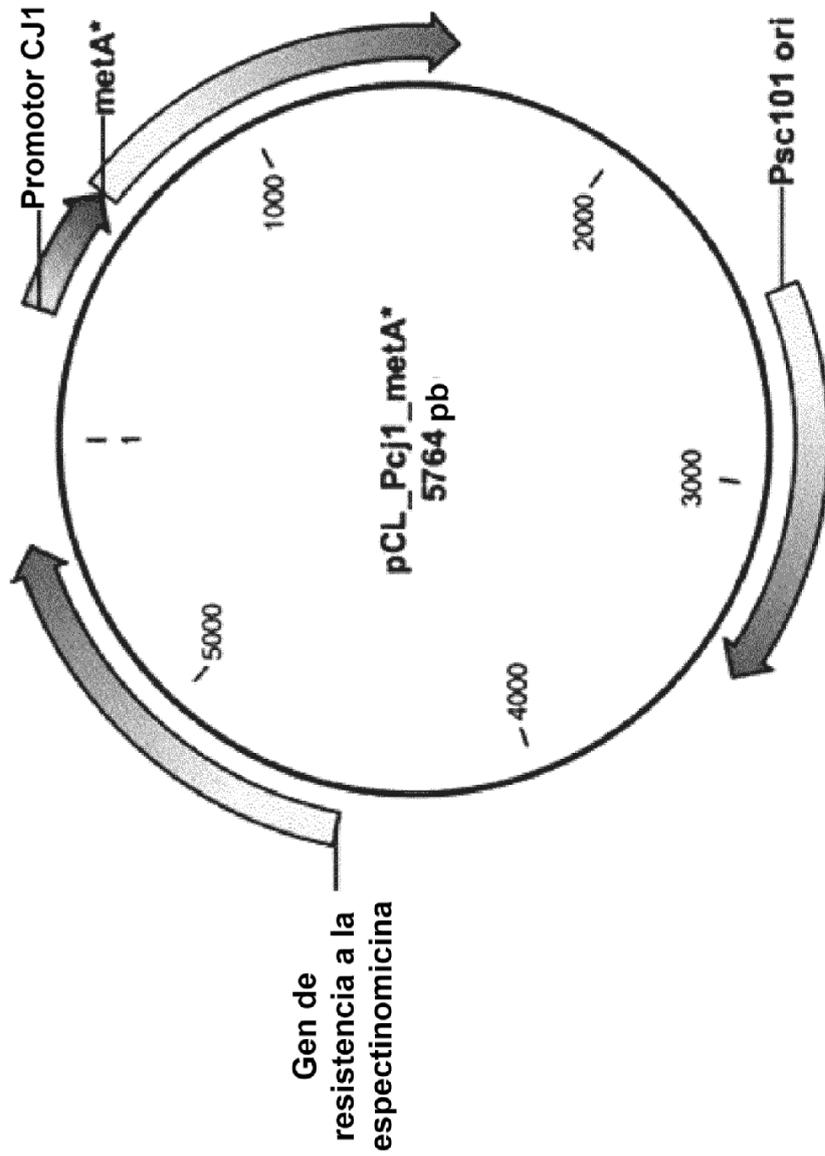
tcttatatct tctggcaagt agacgaaggc atgagtttct ccgaggcgac cacgctggcg	1980
cgggaaatgg gttataaccga accggacccg cgagatgatc tttctggtat ggatgtggcg	2040
cgtaaactat tgattctcgc tctgtgaaacg ggacgtgaac tggagctggc ggatattgaa	2100
attgaacctg tgctgcccgc agagttaaac gccgagggtg atggtgccgc ttttatggcg	2160
aatctgtcac aactcgacga 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	2464

REIVINDICACIONES

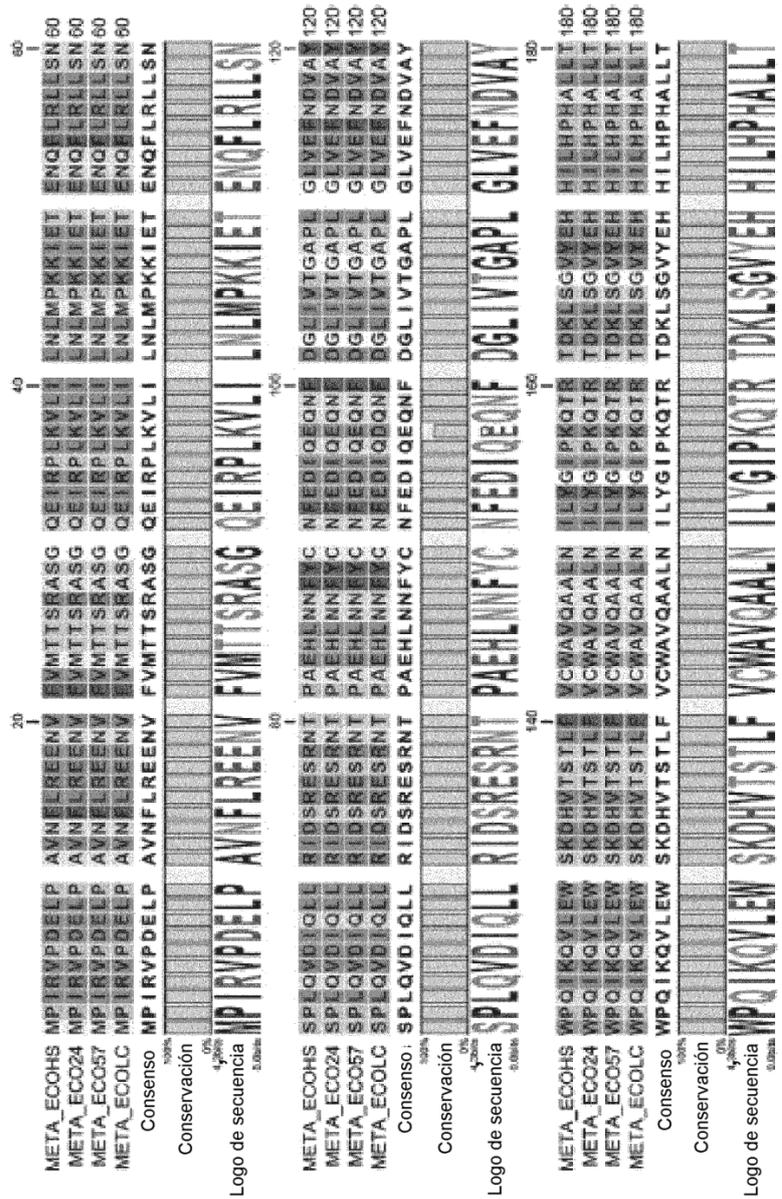
- 5 1. Un polipéptido modificado que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 o al menos el 95 % de homología con la misma, en la que el aminoácido en la posición 111 a partir del aminoácido inicial metionina, de la secuencia se sustituye con ácido glutámico y el aminoácido en la posición 112 de la secuencia se sustituye con treonina o histidina.
2. El polipéptido modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el aminoácido en la posición 112 del polipéptido se sustituye con histidina.
3. El polipéptido modificado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido modificado tiene las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 19 o 20.
- 10 4. El polipéptido modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el aminoácido se sustituye con prolina en la posición 29, se sustituye con glicina en la posición 114, se sustituye con serina en la posición 140, o una o más combinaciones de las mismas.
5. El polipéptido modificado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el aminoácido en la posición 112 del polipéptido se sustituye con histidina.
- 15 6. El polipéptido modificado de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que el polipéptido modificado tiene las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 22 o 23.
7. Un polinucleótido que codifica el polipéptido modificado de la reivindicación 1.
8. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el polinucleótido tiene una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 25, 26, 28 y 29.
- 20 9. Un vector recombinante que comprende secuencias de polinucleótidos enlazadas de manera operativa al polinucleótido de la reivindicación 8.
10. Un microorganismo que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7.
11. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el microorganismo se modifica adicionalmente para tener una actividad acetil-CoA sintetasa mejorada comparada con la actividad acetil-CoA sintetasa endógena o se modifica adicionalmente para tener actividad pantotenato cinasa resistente a la inhibición de retroalimentación mediante acumulación de CoA.
- 25 12. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el número de copias de uno o más genes seleccionados a partir del grupo que consiste en el gen que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc), el gen que codifica la aspartato aminotransferasa (aspC) y el gen que codifica la aspartato semialdehído deshidrogenasa (asd) es elevado, o el promotor del gen se sustituye por un promotor de mejora de actividad o se muta para tener una actividad mejorada.
- 30 13. Un microorganismo transformado con el vector recombinante de la reivindicación 9.
14. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el microorganismo pertenece a los géneros Escherichia, preferentemente pertenece a E.coli, o más preferentemente pertenece al microorganismo depositado con el número de acceso KCCM11146P, KCCM11147P, KCCM11229P o KCCM11230P.
- 35 15. Un procedimiento para producir O-acetil homoserina, que comprende cultivar el microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14; y obtener O-acetil homoserina que se produce durante el cultivo del microorganismo.

40

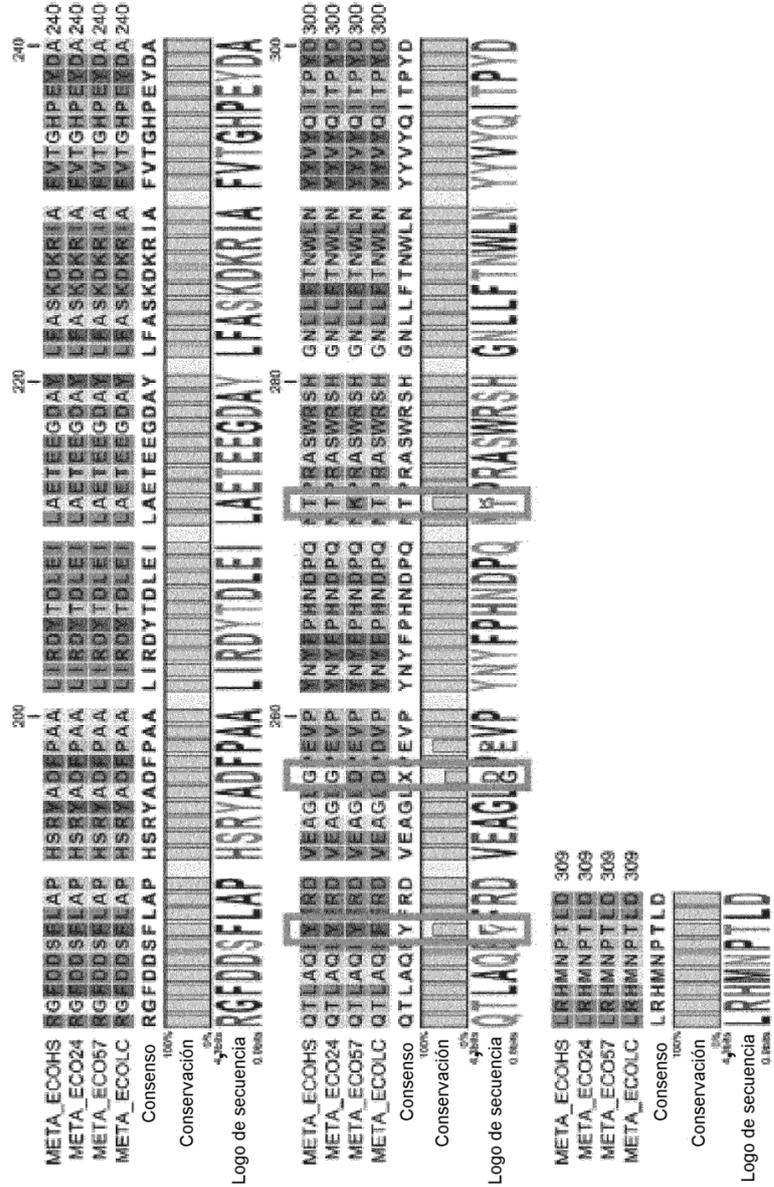
[FIG. 1]



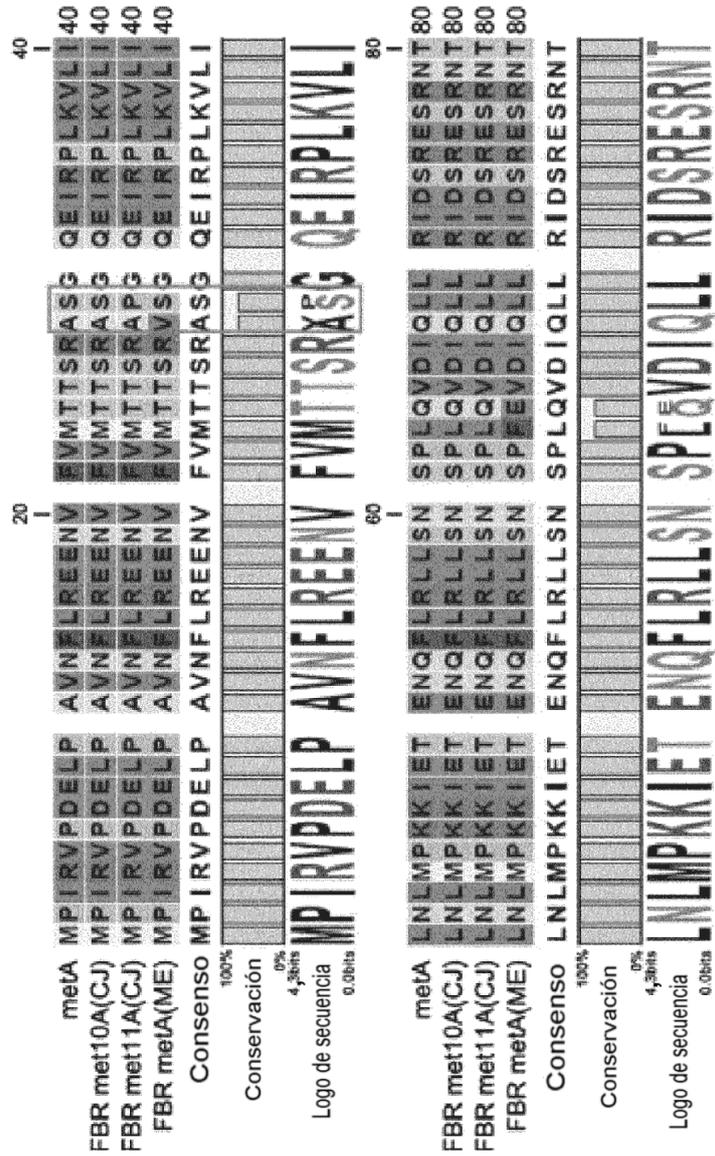
[FIG. 2a]



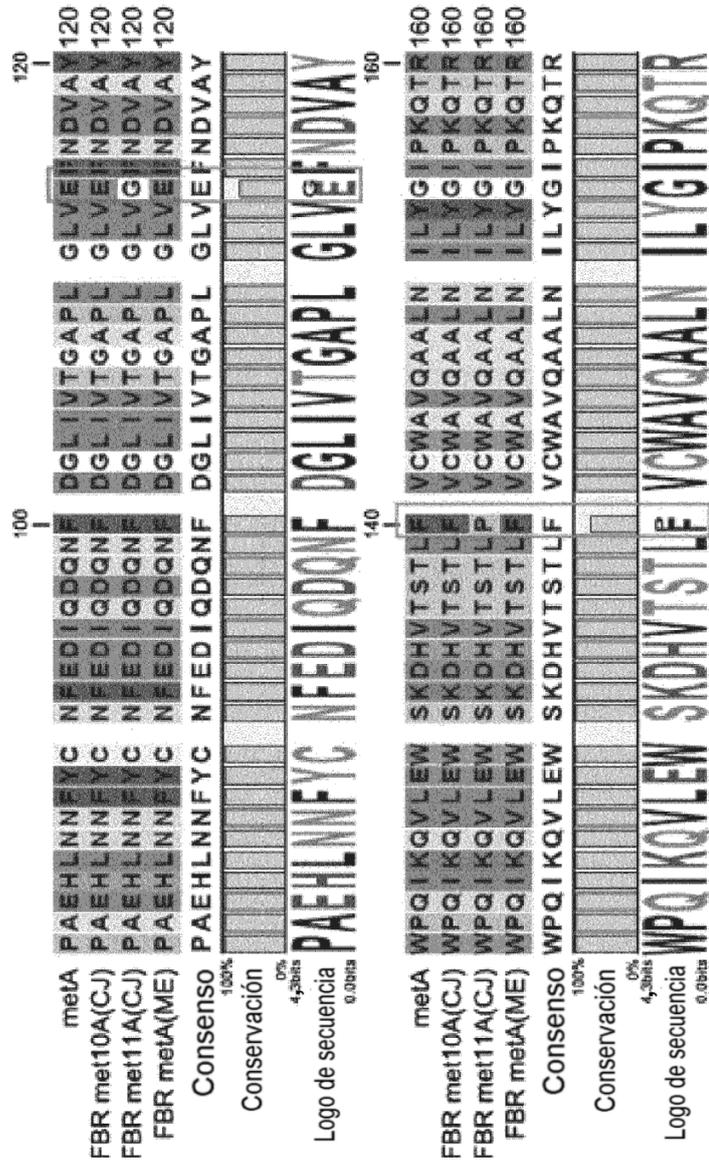
[FIG. 2b]



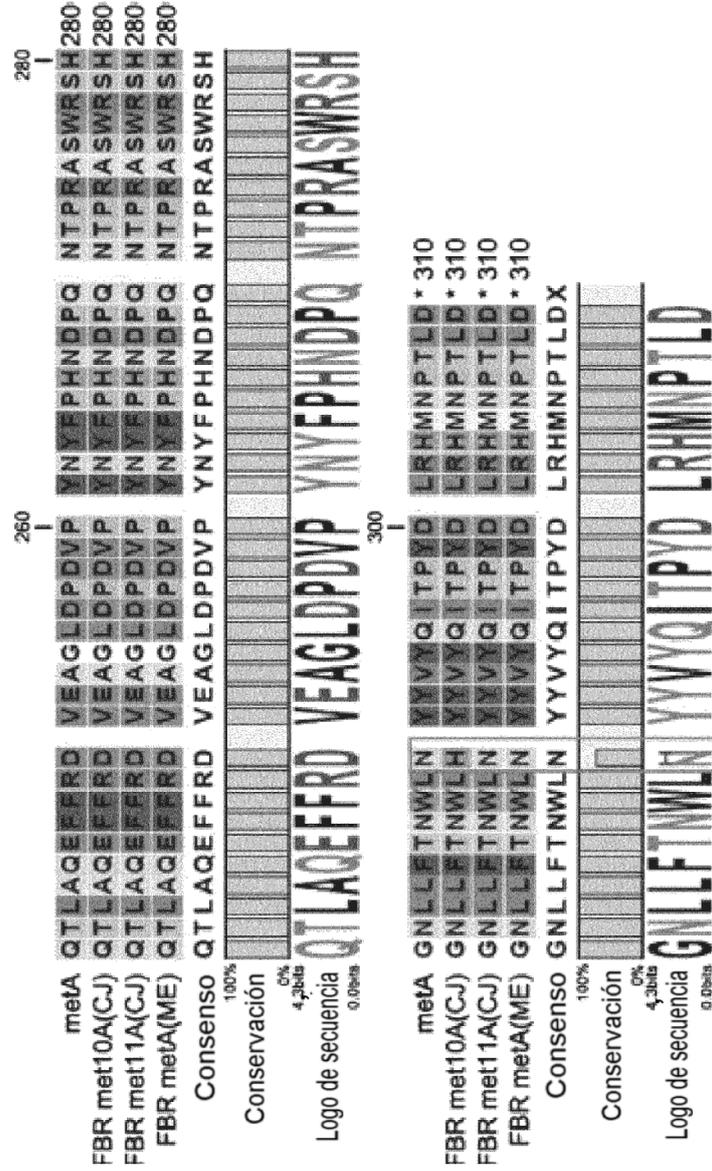
[FIG. 3a]



[FIG. 3b]



[FIG. 4b]



[FIG. 5]

