

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 479**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/12** (2006.01)

**C12R 1/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2010 E 10250459 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2292783**

54 Título: **Microorganismo que produce O-acetil-homoserina y procedimiento de producción de O-acetil-homoserina usando el microorganismo**

30 Prioridad:

**28.08.2009 US 550099**

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

**02.11.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

**ES 2 688 479 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Microorganismo que produce O-acetil-homoserina y procedimiento de producción de O-acetil-homoserina usando el microorganismo

5

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

La presente invención se refiere a una cepa de microorganismos capaz de producir O-acetil homoserina, un precursor de L-metionina, con alto rendimiento. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de O-acetil homoserina con alto rendimiento usando la cepa de microorganismos.

**2. Descripción de la técnica relacionada**

15

La metionina puede sintetizarse química o biológicamente para su utilización en alimentos para animales, alimentos y medicinas.

20

En la síntesis química, en general, la metionina se produce mediante la hidrólisis de 5-(p-metilmercaptoetil)-hidantoína. Sin embargo, la metionina sintetizada está desventajosamente presente en una mezcla de formas L y D que necesita un proceso adicional difícil para separarlas entre sí. Para resolver este problema, los presentes inventores desarrollaron un procedimiento biológico para sintetizar selectivamente L-metionina, un producto químico cuya patente (documento WO 2008/103432) ya ha sido solicitada. El procedimiento, denominado brevemente "un proceso de dos etapas", comprende la producción fermentativa de un precursor de L-metionina y la conversión enzimática del precursor de L-metionina a L-metionina. El precursor de metionina preferiblemente incluye O-acetilhomoserina y O-succinil homoserina. El proceso en dos pasos se evalúa en términos de haber superado los problemas que sufren los procedimientos convencionales, como toxicidad por sulfuro, regulación de retroalimentación en la síntesis de metionina por metionina y SAME, y degradación de compuestos intermedios por cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa y O-acetilhomoserina sulfhidrilasa. Además, en comparación con el procedimiento de síntesis química convencional para producir DL-metionina, el proceso en dos pasos tiene la ventaja de ser selectivo solamente para L-metionina, con la producción concomitante de ácidos orgánicos, como ácido succínico y ácido acético como subproductos útiles.

25

30

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

35



40

En la Publicación de Patente de Estados Unidos de América No. US 2009-0253186 A1 del presente cesionario se divulga una cepa de microorganismos en la que se introducen los genes *thrA* y *metX* para mejorar la biosíntesis de L-homoserina y O-acetil-homoserina, respectivamente, y un procedimiento de producción de O-acetil homoserina con alto rendimiento usando la misma. En este contexto, los presentes inventores concibieron que el enriquecimiento de acetil-CoA, uno de los dos sustratos utilizados en la biosíntesis de O-acetil-homoserina, aumentaría el rendimiento de producción de O-acetil homoserina.

45

En *E. coli*, la acetil-CoA es, en su mayor parte, sintetizada a partir de piruvato. Sin embargo, si hay exceso de glucosa, se puede producir acetil-CoA a partir del ácido acético acumulado en el medio. La síntesis de acetil-CoA a partir de ácido acético puede aprovechar dos vías de biosíntesis diferentes. En la única ruta de biosíntesis de acetil-CoA, se encuentra un intermediario de acetiladenilato (AcAMP) a través del cual la acetil-CoA sintasa (ACS) activa el acetato en acetil-CoA. En la otra vía, el ácido acético se convierte a través de fosfato de acetilo en acetil-CoA como resultado de las reacciones consecutivas catalizadas por la acetato-quinasa (ACK) y la fosfotransacetilasa (PTA) (JOURNAL OF BACTERIOLOGY (Revista de Bacteriología), mayo de 1995, p. 2878-2886). Al tener una alta afinidad por el acetato, la acetil-CoA sintasa, que desempeña un papel fundamental en la ruta de biosíntesis mediada por ella, puede activar el acetato incluso a un nivel intracelular o extracelular bajo en acetil-CoA. Por el contrario, la ruta de biosíntesis de acetil-CoA mediada por ACK-PTA se opera únicamente a un nivel de acetato elevado, que puede resultar de la fermentación de ácidos mixtos, debido a que las enzimas tienen una baja afinidad por el acetato (J. Gen. Microbiol. 102: 327-336).

50

55

60

En cuanto a la acetil-CoA sintasa, su expresión se inhibe a nivel de transcripción por el control de represión de catabolitos hasta el crecimiento exponencial debido al sitio de unión de CRP localizado aguas arriba del promotor y desde ese entonces, su expresión aumenta cuando la célula entra a la fase estacionaria (Mol Microbiol. 2004, Enero; 51 (1): 241 - 54).

65

Por lo tanto, el acetato acumulado en la fase intermedia de la fermentación se puede activar en acetil-CoA a través de la vía ACK-PTA. Sin embargo, si hay un nivel bajo de acetato, la acetil-CoA se convierte en acetato porque la vía ACK-PTA es reversible. Es decir, el agotamiento de acetil-CoA puede ocurrir durante la ruta de ACK-PTA, que muestra un efecto negativo en la síntesis de O-acetil homoserina.

La coenzima A (CoA) utilizada como sustrato junto con acetato en la biosíntesis de acetil-CoA, es un portador del grupo acilo representativo dentro de las células. La coenzima A se sintetiza en una serie de procesos de pantotenato con catálisis enzimática para cada proceso de la siguiente manera. En primer lugar, la pantotenato quinasa (CoaA) activa el pantotenato (vitamina B5) a 4'-fosfopantotenato a la que luego se agrega una cisteína para formar 4'-fosfopantotenoil-L-cisteína, seguido de la descarboxilación a 4'-fosfopanteteína con la cooperación de P-PanCys sintasa/P-PanCys descarboxilasa (coaBC). Posteriormente, la 4'-fosfopanteteína se adenilada para formar defosfo-CoA mediante la enzima fosfopanteteína (P-PanSH) adenililtransferasa (*coaD*). Finalmente, la defosfo-CoA se fosforila utilizando ATP a la coenzima A por la enzima defosfocoenzima A (deP-CoA) quinasa (*CoaE*).

En general, CoA es un cofactor para una multitud de reacciones metabólicas, así como muchas reacciones sintéticas dentro de las células. Por esta razón, su conjunto se mantiene a un nivel constante mediante mecanismos de regulación. El principal actor clave en la regulación del grupo de CoA intracelular es la pantotenato quinasa, que cataliza el primer paso comprometido y es la enzima controladora de la velocidad en la biosíntesis de CoA. La regulación de la actividad de pantotenato quinasa mediante inhibición por retroalimentación es el factor crítico que controla la concentración de CoA intracelular (J Biol Chem., 28 de octubre de 1994; 269 (43): 27051-8). Sin embargo, el nivel constante de CoA mantenido dentro de las células puede ser una barrera para la producción efectiva de O-acetil homoserina a través de acetil-CoA. Se informa que la sustitución de la arginina R en la posición 106 por alanina A altera la pantotenato quinasa por ser sensible a la inhibición por retroalimentación mediante CoA a ser refractaria a la misma (Journal of Bacteriology, 185, junio de 2003, p. 3410-3415). Se descubrió que la proteína de tipo silvestre retenía solo aproximadamente el 20% de la actividad catalítica en presencia de 40 mM de CoA mientras que no se detectaron disminuciones en la actividad catalítica de la proteína mutante R106A a la misma concentración de CoA. Además, se descubrió que una cepa mutante que expresaba la proteína mutante tenía niveles intracelulares significativamente mayores de CoA, en comparación con el tipo silvestre.

El documento WO 2008/013432 se refiere a un procedimiento de producción de L-metionina y ácido orgánico con alto rendimiento mediante la reacción de conversión enzimática a partir del precursor de L-metionina producido por la formación de la cepa de microorganismos productores-precusores de L-metionina.

La investigación intensiva y exhaustiva llevada a cabo por los presentes inventores condujo a la presente invención a la conclusión de que la introducción y mejora de uno o ambos de (a) el gen de pantotenato quinasa refractario a la inhibición por retroalimentación mediante CoA y (b) el gen de O-acetil CoA sintasa da como resultado una mejora significativa en la productividad de O-acetil homoserina, como se describe en la Figura 1.

#### Sumario de la invención

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar una cepa de microorganismos capaz de producir O-acetil homoserina con alto rendimiento, que está diseñada para fortificar una ruta de biosíntesis de acetil-CoA al sobreexpresar un gen *acs* y un gen *coaA* refractario a la inhibición por retroalimentación mediante CoA.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento de producción de O-acetil homoserina con alto rendimiento, usando la cepa de microorganismos.

El objeto para el que se busca protección es como se define en las reivindicaciones. De acuerdo con un aspecto de la presente invención,

se proporciona una cepa de *Escherichia* sp. capaz de producir O-acetil homoserina, caracterizada porque:

a. la cepa de *Escherichia* sp. sobreexpresa un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad de homoserina O-acetiltransferasa; y

b. la cepa de *Escherichia* sp. sobreexpresa (i) un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad de acetil-CoA sintasa, y (ii) un gen que codifica un polipéptido de pantotenato quinasa mutado de modo que la actividad del pantotenato quinasa es refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA, de modo que la ruta de biosíntesis de acetil-CoA de la cepa se fortifica,

en la que dichos genes se sobreexpresan empleando un promotor heterólogo o aumentando un número de copias génicas.

En la presente memoria también se divulga un procedimiento de producción de O-acetil homoserina en un medio de cultivo, que comprende fermentar la cepa en el medio de cultivo.

5 En la presente memoria también se divulga un procedimiento de producción de L-metionina y acetato, que comprende: (a) fermentar la cepa de *Escherichia sp.* para producir O-acetil homoserina; (b) separar la O-acetil homoserina; y (c) convertir la O-acetil homoserina, junto con metil mercaptano, en L-methinoine y acetato en presencia de una enzima seleccionada de un grupo que consiste en cistationina gamma sintasa, O-acetil homoserina sulfhidrilasa y O-succinil homoserina sulfhidrilasa.

10 De acuerdo con la presente invención, por lo tanto, la O-acetil homoserina se puede producir biológicamente con un alto rendimiento, que es más ecológico que los procedimientos químicos. Además, la O-acetil-L-homoserina producida por la cepa de la presente invención puede convertirse en L-metionina y acetato enzimáticamente, por ejemplo, mediante O-acetil-homoserina sulfhidrilasa. La L-metionina es útil como aditivo para la alimentación o la comida de animales.

15

### Breve descripción de los dibujos

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

20

La Figura 1 es una vista esquemática que muestra una ruta de biosíntesis de O-acetil-homoserina a través de la cual se puede producir O-acetil-homo-serina con alto rendimiento;

25

La Figura 2 es una vista esquemática que muestra el mapa genético y la construcción de un vector de expresión pCL-P(pro)-acs que lleva un gen de acetil-CoA sintasa (acs); y

30

La Figura 3 es una vista esquemática que muestra el mapa genético y la construcción de los vectores de expresión pCL-P(pro)-coaA(R106A) y pACYC-coaA(R106A), ambos portadores de un gen que codifica pantotenato quinasa refractario a la inhibición por CoA (*coaA(R106A)*).

### Descripción de las realizaciones preferentes

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una cepa de *Escherichia sp.* capaz de producir O-acetil homoserina, caracterizada porque:

35

a. la cepa de *Escherichia sp.* sobreexpresa un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa; y

40

b. la cepa de *Escherichia sp.* sobreexpresa (i) un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad acetil-CoA sintasa, y (ii) un gen que codifica un polipéptido de pantotenato quinasa mutado de modo que la actividad del pantotenato quinasa es refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA, de modo que la ruta de biosíntesis de acetil-CoA de la cepa se fortifica,

45

en la que dichos genes se sobreexpresan empleando un promotor heterólogo o aumentando un número de copias génicas.

50

Como se usa en la presente memoria, el término "precursor de L-metionina" pretende referirse a un metabolito encontrado en la ruta de biosíntesis de metionina o un derivado de la misma, y particularmente a O-acetil homoserina.

55

Como se usa en esta memoria, el término "cepa productora de O-acetil homoserina" pretende referirse a un microorganismo eucariota o procariota que puede producir O-acetil homoserina intracelular o extracelularmente y particularmente a un microorganismo genéticamente modificado que puede acumular O-acetil homoserina en el mismo. Los ejemplos de cepas útiles en la presente invención incluyen *Escherichia sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Providencia sp.*, *Corynebacteria sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Leptospira sp.*, *Salmonella sp.*, *Brevibacteria sp.*, *Hypomononas sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Nocardia sp.*, hongos y levaduras, con preferencia por *Escherichia sp.*, *Corynebacteria sp.* y *Leptospira sp.* y levadura. Más preferente es *Escherichia sp.* Mucho más preferente es *Escherichia coli*. Además, mucho más preferente es una cepa de *E. coli* que puede producir lisina, treonina, isoleucina o metionina. La más preferente es la cepa de *E. coli* (No. de Acceso KCCM 10921P) que se deriva de la cepa productora de treonina descrita en el documento US 12/062835 (es decir, la Publicación de Patente de Estados Unidos de América No. US 2009-0253186 A1) con la introducción de genes *thrA* y *metX* en la misma para mejorar la ruta de biosíntesis de O-acetil-L-homoserina.

65

La presente invención proporciona una cepa productora de O-acetil homoserina que mejora la productividad de O-acetil homoserina a través de la fortificación de la ruta de biosíntesis de acetil-CoA con la introducción de un

gen de acetil-CoA sintasa implicado en la ruta de biosíntesis de acetil-CoA en la cepa y la mejora de la misma.

La presente invención proporciona una cepa productora de O-acetil homoserina que mejora la productividad de O-acetil homoserina mediante la fortificación de la ruta de biosíntesis de acetil-CoA con la introducción de un gen de pantotenato quinasa refractario a la inhibición por retroalimentación mediante acumulación de CoA en la cepa y la mejora de la misma.

La presente invención proporciona una cepa productora de O-acetil homoserina que mejora la productividad de O-acetil homoserina a través de la fortificación de la ruta de biosíntesis de acetil-CoA con la introducción de un gen de acetil-CoA sintasa implicado en la ruta de biosíntesis de acetil-CoA y un gen de pantotenato quinasa refractario a la inhibición por retroalimentación por acumulación de CoA en la cepa y mejora de la misma.

Como se usa en la presente memoria, el término "introducción y mejora" pretende significar un aumento en la actividad intracelular de una enzima codificada por el gen correspondiente, que generalmente se puede alcanzar mediante la sobreexpresión del gen. Hay muchos enfoques para la sobreexpresión de un gen objetivo. Por ejemplo, la sobreexpresión puede implementarse mediante la modificación de una base en la región promotora y/o 5'-UTR para el gen objetivo, mediante la introducción de la copia adicional del gen objetivo en el cromosoma, o mediante la introducción del gen objetivo en combinación con un promotor autólogo o heterólogo sobre un vector, seguido de la transformación del vector en una cepa de microorganismos. Adicionalmente, una mutación en el ORF (marco de lectura abierto) del gen objetivo puede dar como resultado la sobreexpresión de la misma. En realizaciones de la invención, la sobreexpresión se implementa empleando un promotor heterólogo o aumentando el número de copias de genes. En términos numéricos, cuando se produce una sobreexpresión, la proteína correspondiente aumenta en actividad o concentración en un 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, 1000% o hasta 2000%, en comparación con cuando se expresa en un estado natural.

Para la introducción y mejora de un gen, se puede tomar un promotor fuerte, una mutación en el promotor correspondiente o un aumento en el número de copias de genes. Preferible es el uso de un promotor fuerte. Siempre que sea constitutivo, se puede usar cualquier promotor en la presente invención sin limitaciones impartidas a la misma. Son útiles pTac, pTrc, pPro, pR y pL, con pPro de SEQ ID NO. 9 es el más preferido. El gen objetivo puede comprender el promotor pPro de SEQ ID NO. 9, total o parcialmente.

Las enzimas acetil-CoA sintasa y pantotenato quinasa pueden provenir de una variedad de microorganismos diferentes y están codificadas por genes denominados "acs" y "coaA" en la presente invención, respectivamente.

En la presente invención, se proporciona una cepa de microorganismos con alta capacidad para producir O-acetil homoserina en la que se realiza una modificación para fortalecer la actividad de acetil-CoA sintasa. También se divulga un procedimiento de producción de O-acetil homoserina usando la misma.

En una realización de la presente invención, la cepa productora de O-acetil-homoserina se prepara como sigue.

Con el fin de aumentar la productividad de O-acetil-L-homoserina, un promotor para el gen que codifica la sintasa de acetil-CoA en una cepa se sustituye con el promotor constitutivo P(pro) de SEQ ID NO. 9, seguido de la construcción de un plásmido de expresión constitutiva para inducir la sobreexpresión del gen objetivo sin represión de catabolito. El gen que codifica la acetil-CoA sintasa generalmente se expresa como *acs*. Se puede obtener a partir de la secuencia del genoma (gi: 89110790) de *Escherichia coli* divulgada previamente (Mol Syst Biol.2006; 2: 2006.0007. Epub 2006, 21 de febrero). Además, la secuencia del gen puede obtenerse de bases de datos públicas tales como las construidas por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, National Center for Biotechnology Information) o el Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ, DNA Data Bank of Japan).

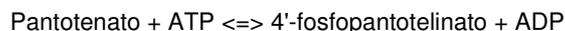
La acetil-CoA sintasa tiene la actividad de catalizar la siguiente reacción. Si se mejora, la expresión del gen que codifica la enzima induce la acumulación intracelular de acetil-CoA.



A continuación, la cepa que alberga el plásmido de expresión constitutiva se manipula para aumentar aún más la síntesis de acetil-CoA. El enfoque adoptado en esta invención es incapacitar la inhibición por retroalimentación contra la síntesis de CoA. En este contexto, la pantotenasa quinasa, que cataliza la primera etapa comprometida y es la enzima que controla la velocidad en la biosíntesis de CoA, es mutada para ser refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA. Para esto, se introduce una mutación en el gen que codifica la pantotenato quinasa, es decir, *coaA(R106A)*. Este gen puede obtenerse a partir de la secuencia del genoma (gi: 89110060) de *Escherichia coli* descrita previamente (Mol Syst Biol.2006; 2: 2006.0007. Epub 2006, 21 de febrero). Además, la secuencia del gen puede obtenerse a partir de bases de datos públicas tales como las construidas por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) o el Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ).

Además de tener la actividad de catalizar la fosforilación de la pantotenasa a 4-fosfopantotenato como se muestra en la siguiente reacción, la pantotenato quinasa mutada es insensible a la inhibición por retroalimentación mediante CoA. Por lo tanto, la potenciación del gen que codifica la pantotenasa quinasa mutada aumenta el nivel intracelular del conjunto de CoA.

5



La cepa mutante así obtenida acumula en ella cantidades de CoA y acetil-CoA que se usan como sustratos, junto con homoserina, para la producción de O-acetil-L-homoserina por la enzima codificada por metX. Por lo tanto, la cepa mutante puede producir O-acetil-L-homoserina con alto rendimiento.

10

Como tal, tres cepas productoras de O-acetil homoserina, CJM-X/(pCL-P(pro)-Acs), CJM-X/(pCL-P(pro)-coaA(R106A)) y CJM-X/(pCL-P(pro)-acs, pACYC-coaA(R106A)), se denominaron "*Escherichia coli* CA05-0565", "*Escherichia coli* CA05-0564" y "*Escherichia coli* CA05-0566", respectivamente, y se prepararon y depositado en KCCM (Korean Culture of Microorganism (Cultivo de Microorganismos Coreano, Eulim build, Hongje-1-Dong, Seodaemun-ku, Seúl, 361-221, Corea) el 11 de agosto de 2009, con los números de acceso KCCM11023P, KCCM11022P y KCCM11024P, respectivamente.

15

En una realización preferente de la presente invención, se proporciona una cepa productora de O-acetil homoserina en la que *acs*, es un gen implicado en la biosíntesis de acetil-CoA, se sobreexpresa bajo el control del promotor constitutivo Pro. Con más detalle, el promotor pRro está compuesto por la secuencia de longitud completa o por una parte de la SEQ ID NO. 9.

20

En otra realización preferente de la presente invención, se proporciona una cepa productora de O-acetil homoserina en la que una pantotenato quinasa responsable de la etapa comprometida de la biosíntesis de CoA es refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA. Además, en la presente memoria se divulga un procedimiento de producción de O-acetil homoserina con alto rendimiento. Preferiblemente, la pantotenato quinasa refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA está mutada en la posición de aminoácido 106. Más preferiblemente, la pantotenato quinasa está mutada en la posición de aminoácido 106 mediante la sustitución de arginina por alanina, por lo que es refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA. Lo más preferiblemente, la pantotenato quinasa refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8.

25

30

En realizaciones de la presente invención, se proporciona una cepa de *E. coli* productora de O-acetil homoserina en la que los dos enfoques se toman conjuntamente para potenciar tanto la actividad de la acetil-CoA sintasa como la actividad de la pantotenato quinasa.

35

Preferiblemente, la cepa de *E. coli* útil para la preparación de la cepa productora de O-acetil homoserina es capaz de producir lisina, treonina, isoleucina o metionina. Más preferiblemente, la cepa de *E. coli* presenta la introducción y mejora de (a) homoserina acetil transferasa; (b) actividad de aspartoquinasa u homoserina deshidrogenasa; o (c) ambos (a) y (b). Lo más preferible es *E. coli* derivado de CJM-X/pthrA(M)-CL (No. de Acceso KCCM 10921P).

40

En un ejemplo concreto de la presente invención, el gen *acs* se clona y se usa para construir el vector de expresión *acs* pCL-P(pro)-acs que está bajo el control del promotor constitutivo pPro de SEQ ID NO. 9 (Figura 2). Un gen *coaA* está mutado en la posición de aminoácido 106 de arginina a alanina para dar un gen mutante *coaA* de SEQ ID NO. 8 que codifica la enzima refractaria a la inhibición de retroalimentación por CoA. Este gen mutante se clona en plásmidos que llevan el promotor constitutivo pPro de SEQ ID NO. 9, para proporcionar plásmidos de expresión recombinantes, pCL-P(pro)-coaA(R106A) y pACYC-coaA(R106A) (Figura 3) que están bajo el control del promotor constitutivo pPro. Los plásmidos recombinantes pCL-P(pro)-acs, y tanto pCL-P(pro)-coaA(R106A) o pACYC-coaA(R106A) se transforman, solos o en combinación, en CJM-X que se construyó mediante la eliminación de pthrA(M)-CL plásmido de CJM-X/pthrA(M)-CL (No. de Acceso KCCM 10921P), una cepa con un enriquecimiento en *thrA* y *metX* como se divulga en US12/062835 (es decir, Publicación de Patente de EE. UU. No. US 2009-0253186 A1), para preparar cepas productoras de O-acetil homoserina que presenta la introducción y el enriquecimiento de (a) un gen que codifica la acetil-CoA sintasa (*acs*), (b) un gen que codifica pantotenato quinasa refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA (*coaA*) y (c) ambos (a) y (b) genes (ejemplos 1 a 3). El cultivo del frasco mostró que, en comparación con el control CJM-X, la productividad de O-acetil homoserina se incrementó en 2,8 g/l para la cantidad de producción y en 4,7% para el rendimiento de producción en la cepa transformada con pCL-P(pro)-acs el gen de la acetil-CoA sintasa (*acs*) de (a), en 2,1 g/l para la cantidad de producción y en 3,5% para el rendimiento de producción en la cepa transformada con pCL-P(pro)-coaA(R106A) portadora de la pantotenato quinasa refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA de (b) (*coaA*), y en 6,8 g/l para la cantidad de producción y por 11,4% para el rendimiento de producción en la cepa transformada con pCL-P(pro)-acs y pACYC-coaA(R106A) de (b) y (c) (Ejemplo 2, Tabla 2).

45

50

55

60

La presente divulgación también proporciona un procedimiento de producción de O-acetil-homoserina, que

65

comprende la fermentación de la cepa de *E. coli* productora de O-acetil-homoserina en un medio de cultivo para acumular O-acetil-homoserina en el medio.

La presente descripción también proporciona un procedimiento de producción de L-metionina y acetato, que comprende (a) producir O-acetil-homoserina a través de la fermentación de una cepa de *Escherichia sp* que produce O-acetil homoserina. de la presente invención; (b) separar la O-acetil homoserina; y (c) convertir la O-acetilhomoserina separada, junto con metilmercaptano, en L-metionina y acetato en presencia de una transferasa seleccionada de entre cistationina gamma sintasa, O-acetilhomoserina sulfhidrilasa y O-succinilhomoserina sulfhidrilasa.

Cuando está en conexión con la cepa de la presente invención, el procedimiento de producción de L-metionina, que se basa en el uso de la enzima convertidora, cistationina gamma sintasa, O-acetilhomoserina sulfhidrilasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa como se divulga en WO 2008/013432, expedido a los presentes inventores, puede producir un mayor rendimiento en la producción de L-metionina.

La cepa productora de O-acetil-L-homoserina preparada anteriormente puede cultivarse en un medio y condiciones conocidas en la técnica. Como es bien sabido por aquellos familiarizados con la técnica, el procedimiento de cultivo puede ajustarse de acuerdo con la cepa utilizada. La fermentación puede llevarse a cabo en un lote, un cultivo continuo, o un tipo de lote alimentado, pero no se limita a ello. Una variedad de procedimientos de fermentación se divulga en la siguiente referencia: "Biochemical Engineering" (Ingeniería Bioquímica) por James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, p. 138-176.

El medio de cultivo debe cumplir con las condiciones de cultivo para una cepa específica. Una variedad de medios de cultivo de microorganismos se divulga en la siguiente referencia: "Manual of Methods for General Bacteriology" (Manual de Procedimientos para Bacteriología General) por la American Society for Bacteriology, Washington DC, US, 1981. Generalmente, un medio de cultivo incluye varias fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y oligoelementos. Los ejemplos de fuentes de carbono incluyen carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; grasas como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estas fuentes de carbono se pueden usar solos o en combinación. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen fuentes de nitrógeno orgánico, como peptona, extracto de levadura, salsa, extracto de malta, licor de macerado de maíz (CSL, Corn Steep Liquor) y harina de frijol, y fuentes de nitrógeno inorgánico como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, amonio carbonato y nitrato de amonio, que pueden usarse solos o en combinación. Adicionalmente, el medio puede contener dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio y/o las correspondientes sales que contienen sodio de los mismos. Además, el metal puede estar contenido en forma de sales, como sulfato de magnesio o sulfato de hierro, en el medio. Además, también se pueden agregar aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Los medios o los precursores se pueden agregar al cultivo por tipo de lote o continuo.

El pH del cultivo se puede ajustar con un compuesto adecuado, por ejemplo, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfato y ácido sulfúrico. Con el fin de inhibir la generación de burbujas en el cultivo, se puede usar un agente desespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso. Para crear condiciones aeróbicas, el medio de cultivo puede airearse con oxígeno o con gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire). El medio de cultivo se mantiene a 20~45°C y preferiblemente a 25~40°C. La cepa se cultiva a un nivel deseado del precursor de L-metionina preferiblemente durante 10~160 horas.

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se presentan de forma ilustrativa, pero no deben interpretarse como limitativos de la presente invención.

#### **Ejemplo 1: Preparación de cepa productora de O-acetil homoserina**

<1-1> Clonación del gen *acs*

Para la clonación del gen *acs*, el gen *acs* que codifica la sintasa de acetil-CoA se amplificó por PCR con el ADN genómico de *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325) que sirve como molde. La secuencia base del gen *acs* se obtuvo de la base de datos GenBank del NIH (NCBI-gi: 89110790) y se expresa en la SEQ ID NO. 7. Sobre la base de la secuencia base, se amplificó por PCR un ORF que variaba de ATG a TAA usando un conjunto de cebadores (SEC ID NOS. 1 y 2) que contenían los sitios de enzima de restricción EcoRV y HindIII, mientras que se usó el ADN genómico de *Escherichia coli* W3110 como molde en presencia de la ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra™(Stratagene). La PCR se realizó con 30 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, alineamiento a 50°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 2 min para sintetizar un gen *acs* de aproximadamente 2,0 kb que contiene los sitios EcoRV y HindIII.

Después de la digestión con las enzimas de restricción EcoRV y HindIII, el gen *acs* amplificado se ligó a un

vector pPro-GFP que se trató previamente con las mismas enzimas de restricción, para construir un vector de expresión constitutivo recombinante que porta el gen *acs* y que contiene el promotor constitutivo Pro, denominado pCL-P(pro)-acs. La Figura 2 muestra el mapa genético y la construcción del vector de expresión pCL-P(pro)-acs.

5

#### <1-2> Clonación del gen *coaA* resistente a la retroalimentación

Para la clonación de un gen *coaA* resistente a la retroalimentación, se amplificó un gen *coaA* que codifica la sintasa de pantotenato quinasa acetil-CoA refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante PCR con el ADN genómico de *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325) como molde. Para esto, en primer lugar, la secuencia base de un gen *coaA* se obtuvo de la base de datos GenBank del NIH (NCBI-gi: 89110060). Sobre la base de la secuencia base, se diseñó un conjunto de cebadores (SEQ ID NOS.3 y 4) para la amplificación por PCR de un fragmento *coaA* de ATG a TAA para contener el sitio de enzima de restricción EcoRV y el codón GCC, en lugar de CGT de las posiciones de nucleótidos 316~318, para impartir resistencia a la inhibición por retroalimentación mediante CoA. Separadamente, se diseñó un conjunto de cebadores (SEC ID NO. 5 y 6) para la amplificación por PCR de un fragmento *coaA* para contener el sitio de la enzima de restricción HindIII y el codón GCC, en lugar de la CGT de las posiciones de nucleótidos 316~318 por la misma razón que la descrita anteriormente.

Mientras que se utilizó el ADN genómico de *Escherichia coli* W3110 como molde, la PCR se realizó usando los respectivos conjuntos de cebadores sintetizados (SEQ ID NOS. 3 y 4, y SEQ ID NOS. 5 y 6) en presencia del ADN de alta fidelidad de la polimerasa PfuUltra™ (Stratagene), con 30 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 2 min. Como resultado, se obtuvieron dos fragmentos de genes: uno tenía un tamaño de aproximadamente 344 pb que se extendía desde el codón ATG inicial de *coaA*, con una mutación desde el codón CGT hasta el codón GCC en las posiciones de nucleótidos 316 a 318; el otro tenía aproximadamente 642 pb de tamaño, que contenía el codón de terminación TAA, con una mutación del codón CGT al codón GCC en las posiciones de nucleótidos 316 a 318.

Mientras que los dos fragmentos se usaron como moldes, la PCR se llevó a cabo con 10 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 60 segundos, alineamiento a 50°C durante 60 segundos y extensión a 72°C durante 2 minutos, seguida de 20 ciclos de las mismas condiciones térmicas usando un conjunto de los cebadores de SEQ ID NOS. 3 y 6. Como resultado, se obtuvo un gen de 963 pb en el que el codón GCC se substituyó por el codón CGT en las posiciones 316 a 318 (*coaA*(R106A)).

Después de la digestión con las enzimas de restricción EcoRV y HindIII, el gen mutante *coaA* se clonó por ligamiento a un vector pPro-GFP para construir un vector de expresión recombinante, denominado *pCL-P(pro)-coaA*(R106A), que estaba bajo el control del promotor constitutivo Pro (SEC ID NO. 9) y portaba un gen *coaA* mutante en el que el codón para un resto de aminoácido en la posición 106 se mutó de CGT a GCC. La secuencia de aminoácidos mutante *coaA* se expresa en la SEQ ID NO. 8.

A continuación, el gen mutante *coaA* se clonó en un vector pACYC177. El plásmido recombinante pCL-P(pro)-*coaA*(R106A) se trató con las enzimas de restricción para cortar un fragmento *coaA*(R106A) de 1,45 kb que contenía el promotor Pro del mismo. El fragmento *coaA*(R106A) se insertó en un vector pACYC177 que se trató previamente con BamHI y HindIII para proporcionar un vector recombinante pACYC-*coaA*(R106A). En la Figura 3, se ilustra esquemáticamente la construcción de los vectores de expresión recombinantes pCL-P(pro)-*coaA*(R106A) y pACYC-*coaA*(R106A).

#### <1-3> Preparación de la cepa productora de O-acetil-homoserina

Los plásmidos construidos en los Ejemplos <1-1> y <1-2>, pCL-P(pro)-acs, y *pCL-P(pro)-coaA*(R106A), se transformaron en la cepa CJM-X, que fue construida eliminando el plásmido *pthrA*(M)-CL de CJM-X/*pthrA*(M)-CL (No. de Acceso KCCM 10921P) descrito en US12/062835 (es decir, Publicación de Patente de Estados Unidos de América No. US 2009-0253186 A1), seguido de incubación en LB-Sp (10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 10 g/l de triptona, 25 µg/l de espectinomicina) para seleccionar 10 colonias resistentes a espectinomicina para cada transformante. Además, la CJM-X que anclaba el vector pCL-P(pro)-acs se transformó con el plásmido de expresión recombinante construido en el Ejemplo <1-2>, pACYC-CoaA (R106A), y se cultivó en LB-Sp-Ap (10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 10 g/l de triptona, 25 µg/l de espectinomicina, 50 µg/l de ampicilina) para seleccionar 10 colonias resistentes tanto a espectinomicina como a ampicilina. Se compararon entre sí por la productividad de O-acetil homoserina.

#### 60 **Ejemplo 2: Fermentación para producción de O-acetil homoserina**

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

65 Para este cultivo, se empleó el medio de titulación de O-acetil-homoserina que se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Composición del medio para la producción de O-Acetil-Homoserina	
<i>Composición</i>	<i>Concentración (por litro)</i>
Glucosa	60 g
Sulfato de amonio	17 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5 mg
MnSO <sub>4</sub> · 8H <sub>2</sub> O	5 mg
ZnSO <sub>4</sub>	5 mg
CaCO <sub>3</sub>	30 g
Extracto de levadura	2 g
Metionina	0,15g
Treonina	0,15g

5 Las colonias individuales que se generaron en placas LB durante la incubación por la noche a 32°C se tomaron con bucles de platino y se inocularon respectivamente en 25 ml del medio de titulación de O-acetil homoserina, seguido de cultivo a 32°C durante 42~64 horas con agitación en 250 rpm. Cada cultivo se analizó cuantitativamente para O-acetil homoserina usando HPLC. Los datos del análisis se resumen en la Tabla 2, a continuación.

10 En comparación con la cepa de control CJM-X, como se muestra en la Tabla 2, la cantidad y el rendimiento de producción de O-acetil homoserina aumentaron 2,8 g/l y 4,7%, respectivamente, tras la sobreexpresión del gen *acs* bajo el control del promotor de expresión constitutiva P(pro), en 2,1 g/l y 3,5%, respectivamente, tras la sobreexpresión del gen *coaA(R106A)* refractario a la inhibición por retroalimentación, y en 6,8 g/l y 11,4%, respectivamente, tras la sobreexpresión concomitante de ambas *acs* y *coaA(R106A)*.

15 Tomados en conjunto, los datos obtenidos en las pruebas de matraz indican que la introducción y mejora de uno o ambos *genes*, el gen *acs* y el gen *coaA* refractario a la inhibición por *retroalimentación*, conduce a un aumento en la productividad y el rendimiento de producción de O-acetil homoserina.

20 Tabla 2

Efectos de la expresión de Acs y CoaA(R106) en la producción de O-Acetil-Homoserina			
<i>Cepa</i>	<i>Plásmido</i>	<i>Producción de OAH (g/L)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
CJM-X	-	17,5	29,1
	pCL-P(pro)-acs	20,3	33,8
	pCL-P(pro)-coaA(R106A)	19,6	32,6
	pCL-P(pro)-acs, pACYC-coaA(R106A)	24,3	40,5

#### [Aplicabilidad industrial]

25 Como se describió hasta ahora, la presente invención proporciona una cepa de *Escherichia* sp. que produce O-acetil homoserina con alto rendimiento en un medio de cultivo cuando se fermenta en el medio. Además, la O-acetil homoserina se puede convertir, junto con metil mercaptano, en L-metionina en presencia de una enzima convertidora de metionina, con la producción concomitante de ácido acético.

30 <110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Microorganismo que produce O-acetil-homoserina y procedimiento de producción de O-acetil-homoserina usando el microorganismo.

<130> OPA09051  
 <150> US12/550,099  
 <151> 2009-08-28  
 5 <160> 9  
 <170> KopatentIn 1.71  
 10 <210> 1  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador directo para acs  
 <400> 1  
 20 atcatgagcc aaattcacia acac 24  
 <210> 2  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador inverso para acs  
 <400> 2  
 30 ctggcaaagc ttttacgatg gcatcgcat ag 32  
 <210> 3  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para coaA(R106A)  
 40 <400> 3  
 atcatgagta taaaagagca aacg 24  
 <210> 4  
 <211> 33  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para coaA(R106A)  
 50 <400> 4  
 ggcgctgcaa tacggcggcg gttgtacttt tcc 33  
 <210> 5  
 55 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Cebador directo para coaA(R106A)  
 <400> 5  
 gccgtattgc aggcgctatt aagcc 25  
 65 <210> 6

# ES 2 688 479 T3

<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5  
<220>  
<223> Cebador inverso para coaA(R106A)

<400> 6  
ctggcaaagc ttttattgc gtagtctgac ctc 33

10  
<210> 7  
<211> 1959  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli W3110

15  
<400> 7

20

25

30

35

40

45

50

55

60

ES 2 688 479 T3

atgagccaaa ttcacaaaca caccattcct gccaacatcg cagaccgttg cctgataaac	60
cctcagcagt acgaggcgat gtatcaacaa tctattaacg tacctgatac cttctggggc	120
gaacagggaa aaattcttga ctggatcaaa ccttaccaga aggtgaaaaa cacctccttt	180
gcccccgga atgtgtccat taaatggtac gaggacggca cgctgaatct ggcggcaaac	240
tgccttgacc gccatctgca agaaaacggc gatcgtaccg ccatcatctg ggaaggcgac	300
gacgccagcc agagcaaaca tatcagctat aaagagctgc accgcgacgt ctgccgttc	360
gccaatacc tgctcgagct gggcattaa aaaggtgatg tggtggcgat ttatatgccg	420
atggtgccgg aagccgcggt tgcgatgctg gcctgcgccc gcattggcgc ggtgcattcg	480
gtgattttcg gggccttctc gccggaagcc gttgccgggc gcattattga ttccaactca	540
cgactggtga tcaactccga cgaaggtgtg cgtgccgggc gcagtattcc gctgaagaaa	600
aacgttgatg acgcgctgaa aaaccgaac gtcaccagcg tagagcatgt ggtggtactg	660
aagcgactg gcgggaaaat tgactggcag gaagggcgcg acctgtggtg gcacgacctg	720
gttgagcaag cgagcgatca gcaccagcg gaagagatga acgccgaaga tccgctgttt	780
attctctaca cctccggttc taccgtaag ccaaagggtg tgctgcatac taccggcgg	840
tatctggtgt acgcggcgt gacctttaa tatgtctttg attatcatcc gggatgatc	900
tactggtgca ccgccgatgt gggctgggtg accggacaca gttacttgct gtacggccc	960
ctggcctgcg gtgcgaccac gctgatgttt gaagggctac ccaactggcc gacgcctgcc	1020
cgatggcgc aggtggtgga caagcatcag gtcaatattc tctataccgc acccagggc	1080
atccgcgcgc tgatggcgga aggcgataaa gcgatcgaag gcaccgaccg ttcgtcgtg	1140
cgcattctcg gttccgtggg cgagccaatt aaccggaaag cgtgggagtg gtactggaaa	1200
aaaatcggca acgagaaatg tccggtggtc gataacctgtt ggcagaccga aaccggcgg	1260
ttcatgatca ccccgtgcc tggcgtacc gagctgaaag ccggttcggc aacacgtccg	1320
ttcttcggcg tgcaaccggc gctggtcgat aacgaaggta acccgtgga gggggccacc	1380
gaaggtagcc tggtaatcac cgactcctgg ccgggtcagg cgcgtacgct gtttggcgat	1440
cacgaacggt ttgaacagac ctacttctcc acctcaaaa atatgtattt cagcggcgac	1500
ggcgcgcgct gcgatgaaga tggctattac tggataaccg ggcgtgtgga cgacgtgctg	1560
aacgtctccg gtcaccgtct ggggacggca gagattgagt cggcgtggt ggcgatccg	1620
aagattgccg aagccgccgt agtaggtatt ccgcacaata ttaaaggta ggcgatctac	1680
gcctacgtca cgcttaatca cggggaggaa ccgtcaccag aactgtacgc agaagtccgc	1740
aactgggtgc gtaaagagat tggcccgtg gcgacgccag acgtgctgca ctggaccgac	1800
tcctgccta aaaccgctc cggcaaaatt atgcgccgta ttctgcgcaa aattgcggcg	1860
ggcgatacca gcaacctggg cgatacctcg acgcttgccg atcctggcgt agtcgagaag	1920
ctgcttgaag agaagcaggc tatcgcgatg ccatcgtaa	1959

ES 2 688 479 T3

<211> 316  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli* w3110

5 <400> 8

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 Ala 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

<210> 9  
 <211> 134

10

# ES 2 688 479 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Promotor pPro

<400> 9

```
tcgagcatag ctttttattc cataagatta gcggatctaa cttttacaat tgtgagcgct      60
cacaattatg atagattcaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacagaat tcattaaaga      120
ggagaaaggt acat                                                           134
```

10

**REIVINDICACIONES**

1. Una cepa de *Escherichia* sp. capaz de producir O-acetil homoserina, **caracterizada porque:**

- 5 a. la cepa de *Escherichia* sp. sobreexpresa un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad de homoserina O-acetiltransferasa; y  
 b. la cepa de *Escherichia* sp. sobreexpresa (i) un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad acetil-CoA sintasa, y (ii) un gen que codifica un polipéptido de pantotenato quinasa mutado de modo que la actividad de pantotenato quinasa es refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA, de modo  
 10 que la ruta de biosíntesis de acetil-CoA de la cepa se fortifica,

en la que dichos genes se sobreexpresan empleando un promotor heterólogo o aumentando un número de copias génicas.

15 2. La cepa de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el promotor se selecciona de un grupo que consiste en pTrc, pPro, pR y pL.

3. La cepa de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el promotor es un promotor pPro que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 9.

20 4. La cepa de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido de pantotenato quinasa mutado tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la de una enzima de tipo silvestre como se define por NCBI Gene ID 948479 en la posición 106.

25 5. La cepa de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la secuencia de aminoácidos tiene un resto de alanina en la posición 106, en lugar de arginina para la enzima de tipo silvestre.

6. La cepa de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la secuencia de aminoácidos tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.8.

30 7. La cepa de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cepa es la cepa capaz de producir lisina, treonina, isoleucina o metionina.

35 8. La cepa de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cepa es la cepa de con número de Acceso No. KCCM 10921P que ha sido modificada para sobreexpresar i) un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad acetil-CoA sintasa y ii) un gen que codifica un polipéptido de pantotenato quinasa mutado tal que la actividad del pantotenato quinasa es refractaria a la inhibición por retroalimentación mediante CoA, de manera que la ruta de biosíntesis de acetil-CoA de la cepa se fortifica.

40 9. La cepa de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cepa es *Escherichia coli* CA05-0566 con número de Acceso No. KCCM11024P.

10. La cepa de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cepa es *Escherichia coli*.

45

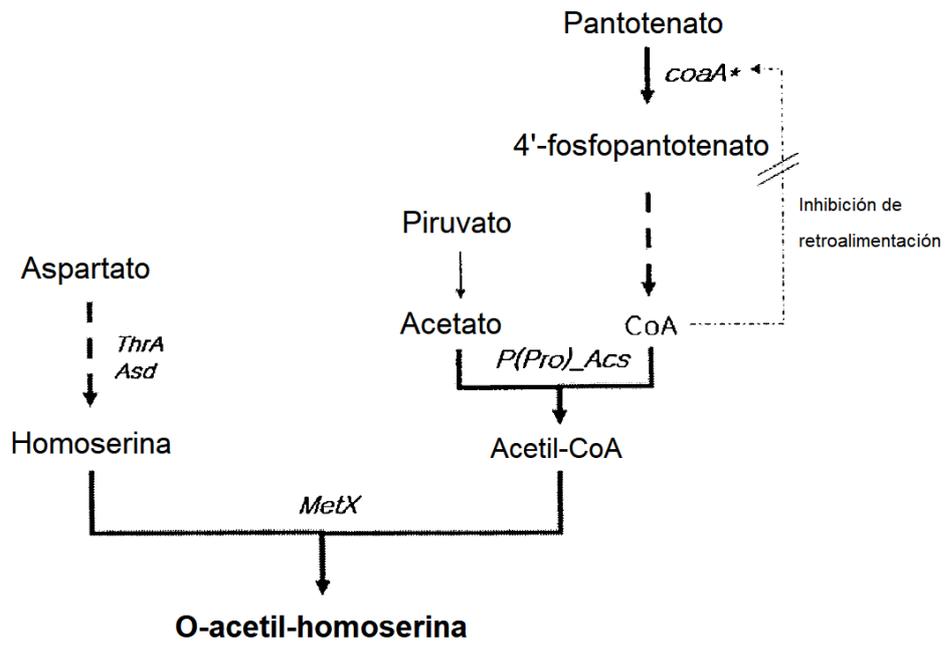


Figura 1

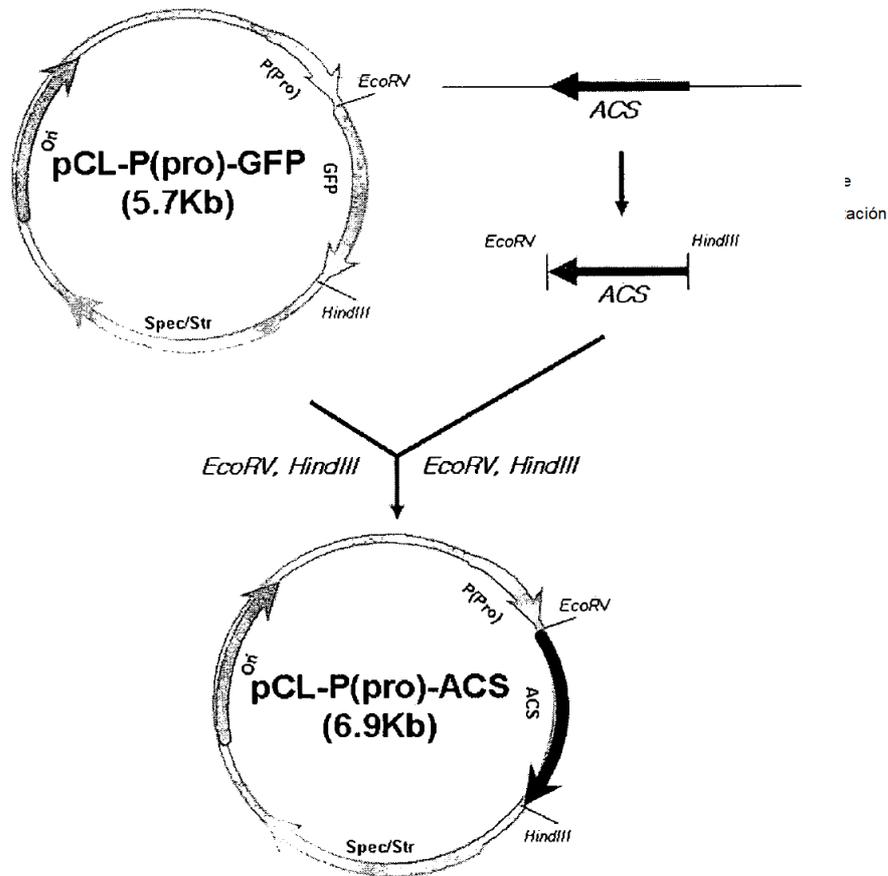


Figura 2

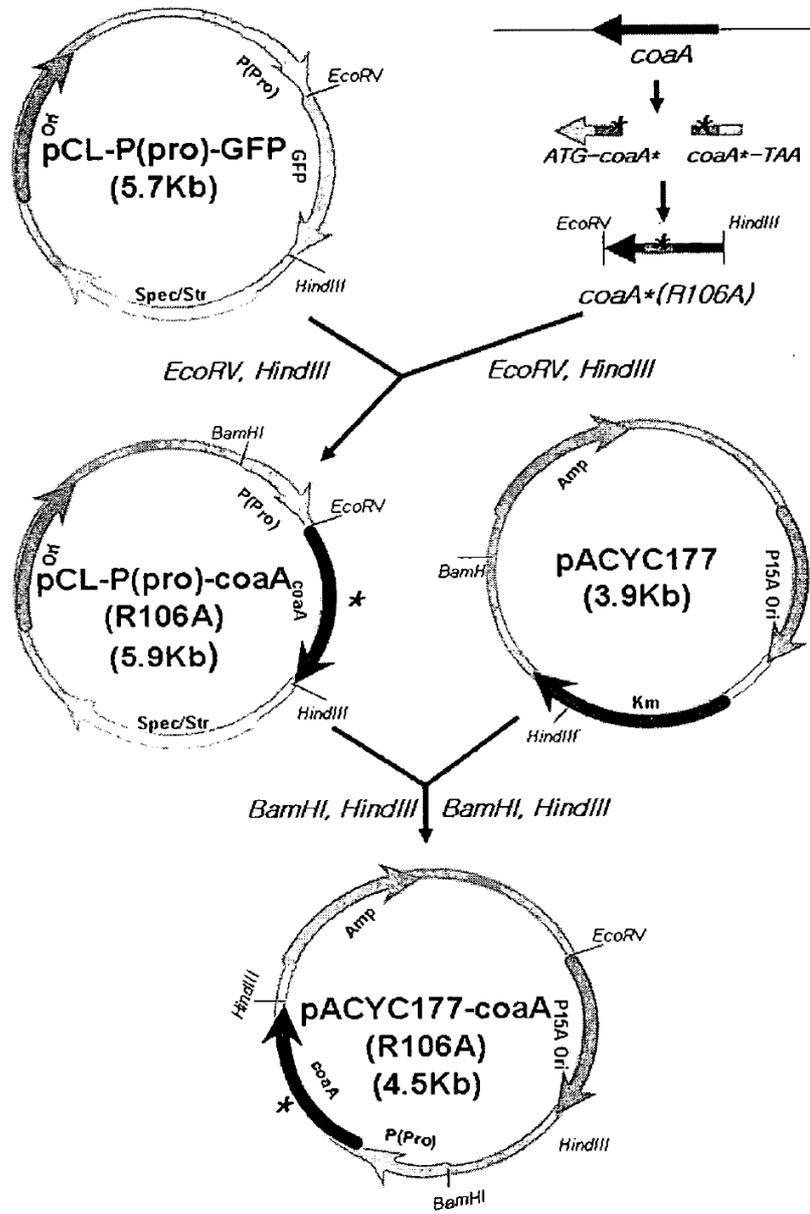


Figura 3