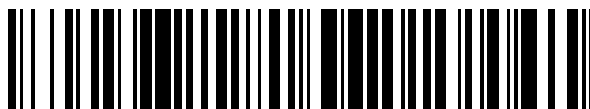


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 939**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 13/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2014** **PCT/KR2014/009970**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015** **WO15060649**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2014** **E 14855796 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019** **EP 3061814**

54 Título: **Microorganismo que produce O-succinil homoserina y método para producir O-succinil homoserina usando el mismo**

30 Prioridad:

23.10.2013 KR 20130126602

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

26.06.2019

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
330 Dongho-ro Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**SEO, CHANG IL;
KIM, SO YOUNG;
SHIN, YONG UK;
NA, KWANG HO;
UM, HYE WON y
HEO, IN KYUNG**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 717 939 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-succinil homoserina y método para producir O-succinil homoserina usando el mismo

5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a una O-succinilserina que produce un microorganismo de *Escherichia sp.* que expresa un polipéptido que tiene una resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina y una actividad de la homoserina O-succiniltransferasa, y a un método para producir O-succinilhomoserina usando el mismo.

10

[Técnica antecedente]

Se sabe que la mayoría de los microorganismos presentes en la naturaleza utilizan O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina como un intermedio para la biosíntesis de metionina. Generalmente, la O-succinilhomoserina se produce por la homoserina O-succiniltransferasa (MetA) que conjuga el grupo succinil de succinil-coA con la homoserina, y la O-acetilhomoserina se produce por la homoserina O-acetiltransferasa (MetX) que conjuga el grupo acetilo de acetil-coA con homoserina. Es decir, en la producción de O-succinilhomoserina entre intermedios, *metA* es uno de los genes más importantes en el desarrollo de microorganismos que producen la misma. Mientras tanto, a diferencia de MetA, se sabe que MetX no está inhibido por retroalimentación y tiene una alta estabilidad enzimática.

20

La O-succinilhomoserina puede producirse usando una cepa con una delección del gen *metB* que codifica la cistationina gamma sintasa en la ruta de biosíntesis de la metionina. Sin embargo, la cepa productora de O-succinilhomoserina requiere L-metionina. Por esta razón, la actividad de la homoserina O-succiniltransferasa se inhibe al ser sometida a inhibición por retroalimentación por la metionina añadida al medio, y eventualmente, la O-succinilhomoserina no se puede obtener a una alta concentración.

25

Por consiguiente, muchas patentes anteriores han centrado sus estudios en la liberación de la inhibición por retroalimentación de *metA* de un sistema de control por retroalimentación (por ejemplo, los documentos EP2128264 A1 o WO2008/013432 A1). Sin embargo, la homoserina O-succiniltransferasa codificada por *metA* tiene problemas ya que la propia proteína natural tiene una baja estabilidad y dado que la introducción de una mutación para la liberación de la inhibición por retroalimentación agrava la inestabilidad. Por consiguiente, para el desarrollo de una cepa productora de O-succinilhomoserina con alta productividad, es necesario eliminar la inhibición por retroalimentación del gen *metA* y asegurar la estabilidad enzimática.

30

35 [Divulgación]

[Problema técnico]

Para resolver el fenómeno de la inhibición por retroalimentación de *metA* y el problema de inestabilidad enzimática descrito anteriormente, los presentes inventores se han esforzado por desarrollar una homoserina O-succiniltransferasa, que ha asegurado la estabilidad enzimática sin inhibirse por la metionina, y en este sentido, se criban nuevas enzimas que tienen la actividad. Como resultado de la selección de los genes candidatos cribados de este modo y el cultivo en un matraz después de introducirlos en *Escherichia sp.*, los presentes inventores han descubierto la producción de O-succinilhomoserina y que los genes cribados de este modo tienen una actividad de homoserina O-succiniltransferasa y una resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina, completando así la presente invención.

45

[Solución técnica]

Un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo para producir O-succinilhomoserina, que expresa un polipéptido que tiene resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina y una actividad de homoserina O-succiniltransferasa.

50

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para producir O-succinilhomoserina usando el microorganismo anterior.

55

[Efectos ventajosos de la invención]

El microorganismo para producir O-succinilhomoserina que incluye el polipéptido, que tiene una resistencia a la

inhibición por retroalimentación por metionina y una actividad de homoserina O-succiniltransferasa, puede tener una resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina y producir O-succinilhomoserina con alto rendimiento, y por lo tanto, se puede usar eficazmente para la producción de L-metionina, que usa la misma como precursor, con alto rendimiento.

5

[Mejor modo para realizar la invención]

Para lograr los objetivos anteriores, en un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido que tiene una resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina y una actividad de homoserina O-succiniltransferasa.

10

Como se usa en el presente documento, el término "actividad de homoserina O-succiniltransferasa" se refiere a la actividad de convertir la homoserina en O-succinilhomoserina durante la biosíntesis de metionina.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibición por retroalimentación" se refiere a la inhibición de la actividad de la homoserina O-succiniltransferasa por metionina durante la biosíntesis de la metionina.

15

El polipéptido se caracteriza porque tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 que tiene la actividad de homoserina O-succiniltransferasa, y una resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina. Cualquier polipéptido que comparta una homología de secuencia del 80% o más, específicamente del 90% o más, más específicamente del 95% o más, y aún más específicamente del 97% o más con el polipéptido anterior se puede usar en la medida en que el polipéptido tenga la actividad de homoserina O-succiniltransferasa y la resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina sugeridas en la presente invención. La homología se puede determinar utilizando BLAST, que es un algoritmo de referencia, o FASTA de Pearson [Methods Enzymol., 183, 63(1990), a continuación]. Sobre la base del algoritmo BLAST, se han desarrollado los programas llamados BLASTN y BLASTX [www.ncbi.nlm.nih.gov, a continuación].

25

Específicamente, el polipéptido puede codificarse por la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 36, debido a la degeneración del codón, también se pueden usar los polinucleótidos que tienen una homología de secuencia de al menos el 80% con respecto a la secuencia anterior, específicamente el 90% o más, más específicamente el 95% o más, y aún más específicamente el 97% o más.

30

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un vector que incluye el polinucleótido de una manera operable.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una construcción de ADN que incluye la secuencia de nucleótidos del polinucleótido que codifica una proteína de interés, en la que la proteína de interés está unida operativamente a una secuencia reguladora adecuada de manera que la proteína de interés se pueda expresar en un huésped apropiado. La secuencia reguladora puede incluir un promotor capaz de iniciar la transcripción, cualquier secuencia de operador para la regulación de la transcripción, una secuencia que codifique un dominio de unión a ribosoma de ARNm apropiado, y una secuencia que regule la terminación de la transcripción y la traducción. El vector, después de transformarse en un huésped apropiado, puede replicarse o funcionar independientemente del genoma huésped, o puede integrarse en el mismo genoma huésped.

40

El vector utilizado en la presente invención puede no estar particularmente limitado siempre que el vector sea replicable en el huésped, y se puede usar cualquier vector conocido en la técnica.

45

La presente invención proporciona un microorganismo productor de O-succinilhomoserina que expresa un polipéptido, que tiene una resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina y una actividad de homoserina O-succiniltransferasa.

50

Como se usa en el presente documento, el término "un microorganismo productor de O-succinilhomoserina" puede referirse a un microorganismo que puede producir O-succinilhomoserina y almacenarla intracelular y extracelularmente.

El microorganismo para producir O-succinilhomoserina incluye cepas de microorganismos procariotas y eucariotas, por ejemplo, las cepas de microorganismos que pertenecen al género *Escherichia*, el género *Erwinia*, el género *Serratia*, el género *Providencia*, el género *Corynebacterium* y el género *Brevibacterium*, pero sin limitación a los mismos. Específicamente, el microorganismo puede ser un microorganismo que pertenece al género *Escherichia*, por ejemplo, *Escherichia coli*.

55

El microorganismo productor de O-succinilhomoserina puede prepararse usando cepas de microorganismos que producen L-lisina, L-treonina o L-isoleucina, y específicamente, usando una cepa productora de L-treonina. Dado que la cepa productora de L-treonina es una cepa capaz de sintetizar L-treonina y homoserina como un precursor de O-succinilhomoserina, se puede sintetizar una gran cantidad de precursores de metionina, es decir, O-succinilhomoserina, utilizando la cepa.

En la presente invención, la expresión del polipéptido se puede lograr mediante transformación con un vector recombinante que incluye un gen que codifica el polipéptido de manera operativa o insertando un polinucleótido que codifica el polipéptido en el cromosoma, pero los métodos no se limitan a lo mismo.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a un proceso de introducción de un vector que incluye un polinucleótido que codifica una proteína diana en una célula huésped, permitiendo de este modo la expresión del polinucleótido codificado por la proteína en la célula huésped. Para el polinucleótido transformado, no importa si se inserta en el cromosoma de una célula huésped y se ubica en el mismo o se ubica fuera del cromosoma, siempre que se pueda expresar en la célula huésped. El polinucleótido puede insertarse en cualquier forma en la medida en que pueda introducirse en una célula huésped y expresarse en la misma. Por ejemplo, el polinucleótido puede introducirse en una célula huésped en forma de un casete de expresión, que es una construcción de polinucleótido que incluye todos los elementos esenciales necesarios para la autoexpresión. El casete de expresión puede incluir convencionalmente un promotor conectado operativamente al marco de lectura abierto ("ORF", en lo sucesivo en el presente documento) del gen, una señal de terminación de la transcripción, un dominio de unión al ribosoma, y una señal de terminación de la traducción. El promotor utilizado en la presente invención puede no estar particularmente limitado siempre que pueda iniciar la transcripción del polinucleótido que codifica la proteína diana en una célula huésped con alta frecuencia, y se puede usar cualquier promotor conocido en la técnica. Específicamente, se puede usar el promotor *T7*, el promotor *trc*, el promotor *tac*, el promotor *CJ1* (patente coreana número 0620092), etc.

En una forma de realización ejemplar de la presente invención, el gen *metB* que codifica la cistationina gamma sintasa en el microorganismo puede eliminarse adicionalmente o debilitarse.

En una forma de realización ejemplar de la presente invención, el gen *thrB* que codifica la homoserina cinasa y el gen *metA* que codifica la homoserina O-succiniltransferasa en el microorganismo pueden eliminarse adicionalmente o debilitarse.

Adicionalmente, en una forma de realización ejemplar, el microorganismo puede ser *Escherichia sp.*, en el que se potencia adicionalmente la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la aspartato aminotransferasa y la aspartato-semialdehído deshidrogenasa.

En la presente invención, las secuencias de los genes pueden obtenerse de bases de datos tales como el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI).

Como se usa en el presente documento, el término "deleción" se refiere a un tipo de eliminación, dentro del cromosoma, de una parte, o la totalidad de una región de secuencia de nucleótidos de un gen diana de la secuencia de nucleótidos correspondiente al codón de iniciación a la del codón de terminación, o una parte o la totalidad de la región de secuencia de nucleótidos de una región reguladora del mismo.

Como se usa en el presente documento, el término "debilitamiento" se refiere a la eliminación o reducción de la actividad intracelular de al menos una enzima que está codificada por el polinucleótido correspondiente en una cepa de microorganismo. Por ejemplo, la expresión de una proteína puede debilitarse modificando la secuencia reguladora de la expresión o la secuencia de nucleótidos de 5'-UTR de un gen, o la actividad de una proteína puede debilitarse sustituyendo el codón de iniciación o introduciendo una mutación en la región ORF del gen correspondiente.

Como se usa en el presente documento, el término "potenciación" se refiere a un aumento de la actividad intracelular de una enzima que está codificada por el polinucleótido correspondiente. La mejora de la actividad intracelular de una enzima se puede lograr mediante la sobreexpresión de un gen o mediante la introducción de una modificación de la propia secuencia de polinucleótidos.

La sobreexpresión del polinucleótido puede ser una modificación por una sustitución de la secuencia reguladora de

la expresión o una modificación por una mutación, una sustitución del codón de iniciación, una inserción adicional del polinucleótido en el cromosoma o un aumento del número de copias por una introducción usando un vector, o una combinación de los mismos.

- 5 La secuencia reguladora de la expresión es una secuencia que controla la expresión del polinucleótido, que está operativamente conectado a la misma, por ejemplo, un promotor, un terminador, un potenciador, un silenciador, una secuencia de *Shine-Dalgarno*, etc. El codón de iniciación que consiste en TTG o GTG puede sustituirse con ATG para aumentar la actividad enzimática del gen correspondiente o disminuir la actividad enzimática del gen correspondiente por sustitución de la manera opuesta. El polinucleótido puede ser uno con un mayor número de copias al insertarse en un sitio particular dentro del cromosoma. El sitio particular puede incluir, por ejemplo, un transposón o una región intergénica. Además, el polinucleótido puede ser el que se insertó en un vector de expresión, que se introdujo nuevamente en una célula huésped, por lo que tiene un mayor número de copias.

- En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir O-succinilhomoserina que incluye cultivar el microorganismo anterior en un medio para producir O-succinilhomoserina, y obtener la O-succinilhomoserina del microorganismo o el medio.

- El cultivo de la cepa de microorganismo para producir la O-succinilhomoserina preparada anteriormente se puede realizar de acuerdo con el medio apropiado y las condiciones para el cultivo conocidas en la técnica. El proceso de cultivo puede ajustarse fácilmente para su uso por un experto en la técnica de acuerdo con la cepa a seleccionar. Específicamente, el cultivo puede ser un cultivo discontinuo, un cultivo continuo y un cultivo de extracción, pero sin limitación a los mismos. Estos diversos procesos de cultivo se describen, por ejemplo, en una referencia ("Biochemical Engineering" de James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, págs. 138 - 176).

- 25 Los medios utilizados para el cultivo deben cumplir adecuadamente los requisitos para cepas particulares. Ejemplos de los medios para diversos microorganismos se describen, por ejemplo, en una referencia ("Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology, Washington D.C., EE.UU., 1981). Los medios pueden incluir diversas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y elementos traza. Los ejemplos de la fuente de carbono que debe estar contenida en el medio pueden incluir hidratos de carbono tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tal como ácido acético. Estas fuentes de carbono se pueden usar en solitario o en combinación. Los ejemplos de la fuente de nitrógeno que debe contenerse en el medio pueden incluir fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, salsa de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz (CSL) y harina de frijol; y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar en solitario o en combinación. Como fuente de fósforo, el medio puede incluir dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, y sales que contienen sodio, correspondientes. Además, el medio de cultivo puede incluir metales tales como sulfato de magnesio y sulfato de hierro. Además, pueden incluirse aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados, etc. Estos medios de cultivo o precursores pueden añadirse al cultivo en forma de cultivo discontinuo o cultivo continuo.

- Adicionalmente, el pH del cultivo se puede ajustar añadiendo un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico durante el cultivo de una manera apropiada. Además, la formación de burbujas se puede prevenir durante el cultivo utilizando un agente antiespumante, tal como éster de poliglicol de ácido graso. Adicionalmente, se puede añadir un gas oxígeno o un gas que contiene un gas oxígeno (por ejemplo, aire) a un cultivo para mantener las condiciones aerobias en el cultivo. La temperatura del cultivo puede estar en el intervalo de 20°C a 45°C, y específicamente de 25°C a 40°C. El cultivo puede continuarse hasta que se obtenga la cantidad deseada de producto de O-succinilhomoserina, y específicamente durante un periodo de 10 horas a 160 horas.

- La O-succinilhomoserina producida por el método de la presente invención se puede convertir en metionina por la cistationina gamma sintasa o la O-succinilhomoserina sulfhidrilasa. Adicionalmente, el ácido succínico se puede obtener como un subproducto además de la L-metionina, haciendo reaccionar la O-succinil-L-homoserina producida por el método de la presente invención con CH₃SH.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido que tiene una resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina y una actividad de homoserina O-succiniltransferasa, en el que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29. Se confirmó que el nuevo polipéptido aislado

de la presente invención tiene una resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina y que puede producir O-succinilhomoserina con alto rendimiento, y por lo tanto, el polipéptido se puede usar para producir O-succinilhomoserina.

5 [DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION]

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

10 Ejemplo 1: Preparación de una cepa parental basada en una cepa productora de treonina

(1) Deleción del gen *metB*

Para la caracterización de la especificidad de sustrato y la actividad del gen *metX*, una cepa que puede acumular homoserina y tiene una deleción en la utilización de acil homoserina. La cepa se construyó basándose en *FTR2533* (KCCM 10541), una cepa productora de treonina descrita en la publicación de patente Internacional número WO 05/075625.

El gen *metB* que codifica la cistationina sintasa en una cepa productora de treonina, la cepa *FTR2533* (KCCM 10541), se eliminó mediante el método de deleción por PCR FRT en una etapa (PNAS (2000) vol 97: P 6640 - 6645). Se construyó un casete de deleción por PCR usando los cebadores de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, y el vector *pKD3* (PNAS (2000) vol 97: P 6640 - 6645) como plantilla. El análisis por PCR se realizó durante 30 ciclos en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 55°C durante 30 s y polimerización a 72°C durante 1 min.

<SEQ ID NO: 1> 5' ttactctggt gcctgacatt tcaccgacaa agcccagga actcatcac gtgtaggctg gagctgcttc 3'
<SEQ ID NO: 2> 5' ttacccttg ttgcagccc ggaagccatt ttccaggtcg gcaattaaat catatgaata tctccttag 3'

El producto de PCR resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0% y se purificó la banda de ADN de 1,2 kpb obtenida del mismo. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa *FTR2533*, que ya se había transformado con el vector *pKD46* (PNAS (2000) vol97: P6640 - 6645).

Para la electroporación, la cepa *FTR2533* transformada con el vector *pKD46* se cultivó en medio LB que contenía 100 µg/l de ampicilina y L-arabinosa 5 mM a 30°C hasta que la DO600 alcanzó 0,6. El resultado se lavó dos veces con agua destilada estéril y después se lavó una vez con glicerol al 10% para su uso. La electroporación se realizó a 2500 V.

La cepa recuperada se colocó en placas en medio de placa LB que contenía 25 µg/l de cloranfenicol, se cultivó a 37°C durante una noche y se seleccionó la cepa que mostraba resistencia al cloranfenicol. La cepa seleccionada se sometió a PCR usando los mismos cebadores mientras se usaba la cepa como plantilla, y la eliminación del gen *metB* se confirmó observando la presencia de una banda de 1,2 kb del gen en un gel de agarosa al 1,0%. La cepa confirmada de este modo se transformó nuevamente con el vector *pCP20* (PNAS (2000) vol 97: P6640 - 6645) y se cultivó en medio LB, y de nuevo la cepa final con una deleción del gen *metB* que tenía un tamaño reducido de 150 pb, que se confirmó en un gel de agarosa al 1,0%, se construyó realizando una PCR en las mismas condiciones y se confirmó que el marcador de cloranfenicol se eliminó de la cepa. La cepa construida de este modo se denominó "CJMA1".

(2) Deleción del gen *thrB*

El gen *thrB* que codificaba homoserina cinasa se eliminó en la cepa *CJMA1* construida de este modo utilizando el método de deleción por PCR FRT de una sola etapa, como en el caso de la deleción del gen *metB*.

Se construyó un casete de deleción de *thrB* por PCR usando los cebadores de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector *pKD4* (PNAS (2000) vol 97: P 6640 - 6645) como plantilla. El análisis por PCR se realizó durante 30 ciclos en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 55°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 1 min.

<SEQ ID NO: 3> aaagaatatg ccgatcggtt cgggcttagg ctccagtgc ttgtcgttg gtgtaggctg gagctgcttc
<SEQ ID NO: 4> agacaaccga catcgcttc aacattggcg accggagccg ggaaggcaaa catatgaata tctccttag

El producto de PCR resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0% y se purificó la banda de ADN de 1,6 kpb obtenida del mismo. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa *CJMA1*, que ya se había transformado con *pKD46*. La cepa recuperada se puso en placas en un medio de placa LB que contenía 50 µg/l de kanamicina, se cultivó a 37°C durante una noche, y se seleccionó la cepa que mostraba resistencia a la kanamicina. La cepa seleccionada se sometió a PCR en las mismas condiciones utilizando los cebadores de SEQ ID NOS: 3 y 4, y se confirmó la delección del gen *thrB* observando la presencia de una banda de 1,6 kb del gen en un gel de agarosa al 1,0%. La cepa confirmada de este modo se transformó de nuevo con el vector *pCP20* y se cultivó en medio LB, y la cepa final con una delección del gen *thrB* que tenía un tamaño reducido de 150 pb, que se confirmó en un gel de agarosa al 1,0%, se construyó realizando un análisis por PCR en las mismas condiciones y se confirmó que el marcador de kanamicina se eliminó de la cepa. La cepa construida de este modo se denominó "*CJMA2*".

(3) Delección del gen *metA*

Para la caracterización de la especificidad del sustrato y la actividad del gen *metX* derivado de *Chromobacterium Violaceum* en la cepa *CJMA2*, el gen *metA* original en el cromosoma se eliminó basándose en la cepa *CJMA2*, en la que se eliminan los genes *metB* y *thrB*, en la cepa *FTR2533* (KCCM 10541). El gen *metA* se eliminó mediante el método de delección por PCR FRT en una sola etapa.

Se construyó un casete de delección de *metA* por PCR usando los cebadores de SEQ ID NOS: 5 y 6, y el vector *pKD3* (PNAS (2000) vol 97: P6640 - 6645) como plantilla. El análisis por PCR se realizó durante 30 ciclos en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 55°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 1 min.

<SEQ ID NO: 5> caatttcttg cgtgaagaaa acgtctttgt gatgacaact tctcgtgcgt gtgtaggctg gagctgcttc
<SEQ ID NO: 6> aatccagcgt tggattcatg tgcgtagat cgtatggcgt gatctgtag catatgaata tctccttag

El producto de PCR resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0% y se purificó la banda de ADN de 1,2 kpb obtenida del mismo. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa *CJMA2*, que ya se había transformado con el *pKD46*. La cepa recuperada se colocó en placas en medio de placa LB que contenía cloranfenicol, se cultivó a 37°C durante una noche y se seleccionó la cepa que mostraba resistencia al cloranfenicol.

La cepa seleccionada se sometió a PCR en las mismas condiciones utilizando los cebadores de SEQ ID NOS: 5 y 6, y se confirmó la delección del gen *metA* observando la presencia de una banda de 1,1 kb del gen en un gel de agarosa al 1,0%. La cepa confirmada de este modo se transformó de nuevo con el vector *pCP20* y se cultivó en medio LB, y la cepa final con una delección del gen *thrB* que tenía un tamaño reducido de 100 pb, que se confirmó en un gel de agarosa al 1,0%, se construyó realizando un análisis por PCR en las mismas condiciones y se confirmó que el marcador de cloranfenicol se eliminó de la cepa. La cepa construida de este modo se denominó "*CJM2*".

La cepa *CJM2* puede acumular una cantidad excesiva de homoserina en la cepa y puede producir *O*-acetilhomoserina u *O*-succinilhomoserina de acuerdo con la especificidad del sustrato *metX* del plásmido que se está introduciendo.

Ejemplo 2: Selección de polipéptidos que tienen nueva actividad de *O*-succiniltransferasa

Para asegurar la liberación y estabilidad del control por retroalimentación del gen *metA*, se seleccionaron 10 tipos de ortólogos denominados *metX* en el sitio web de KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) y se clonaron en el vector *pCL1920_PCJ1*. La cepa *CJM2* preparada en el Ejemplo 1 se transformó con los 10 tipos diferentes de vectores.

Los 10 tipos diferentes de cepas obtenidos de este modo se sometieron a una evaluación en matraz utilizando el método de cultivo en matraz descrito en el Ejemplo 5-(2) a continuación. *CJM2* es una cepa que puede acumular homoserina. Cuando se introduce un gen de homoserina succiniltransferasa en el *pCL1920*, se puede obtener *O*-succinilhomoserina como producto final, mientras que cuando se introduce un gen de homoserina acetiltransferasa en el *pCL1920*, se puede obtener *O*-acetilhomoserina como producto final. En este sentido, se obtuvo un gen, que es un gen *metX* que codifica la homoserina succiniltransferasa, entre los 10 tipos diferentes ya evaluados. El gen es un gen *metX* derivado de *Chromobacterium Violaceum* que tiene la característica de producir *O*-succinilhomoserina con alto rendimiento (una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID

NO: 36), y los presentes inventores han confirmado que la actividad anterior es una actividad novedosa que nunca se ha informado anteriormente.

Ejemplo 3: Construcción de plásmidos

5 3-1. Construcción de un plásmido que expresa un gen *metA* derivado de *E. coli* natural

El análisis por PCR se realizó utilizando el cromosoma de *E. coli* W3110 (Número de acceso: ATCC 9637) adquirido en Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como plantilla, junto con los cebadores de la SEQ ID NO: 7 y la
10 SEQ ID NO: 8, para amplificar el gen *metA* que codifica la homoserina O-succiniltransferasa.

Los cebadores utilizados en la PCR se prepararon basándose en la secuencia de nucleótidos del cromosoma de *E. coli* (NC_000913) registrada en el GenBank of the National Institutes of Health (NIH GenBank), y los cebadores de la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8 tienen el sitio de restricción *EcoRV* y el sitio de restricción *HindIII*, respectivamente.

15 <SEQ ID NO: 7> 5' AATTGATATCATGCCGATTCGTGTGCCGG 3'
<SEQ ID NO: 8> 5' AATTAAGCTTTTAATCCAGCGTTGGATTCATGTG 3'

El análisis por PCR se realizó por desnaturalización a 94°C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C
20 durante 30 s, hibridación a 56°C durante 30 s, y polimerización a 68°C durante 2 min; y polimerización a 68°C durante 10 min.

El plásmido *pCL1920* que incluía el producto de PCR obtenido de este modo y el promotor *CJ1* (patente Coreana número 0620092) se clonó después del tratamiento con *EcoRV* y *HindIII*, respectivamente. *E. coli* DH5α se
25 transformó utilizando el plásmido clonado y se obtuvo un plásmido seleccionando *E. coli* DH5α transformado de una placa LB que contenía espectinomicina (50 µg/ml). El plásmido obtenido de este modo se denominó *pCL_Pcj1_metA* (wt).

3-2. Construcción de un plásmido que expresa un gen *metA* que tiene resistencia de retroalimentación

30 Se construyó un gen *metA* (*metA* #11) que tenía una resistencia de retroalimentación a la metionina usando un kit de mutagénesis de sitio dirigido; Stratagene, EE.UU.) basado en el *pCL_Pcj1_metA* (wt) preparado en el Ejemplo 3-1 como plantilla.

35 Específicamente, de acuerdo con la divulgación en la publicación de patente Internacional número WO 2008/127240, el 29° aminoácido, serina, se sustituyó con prolina (S29P) usando los cebadores de la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10; el 114° aminoácido, ácido glutámico, se sustituyó con glicina (E114G) usando los cebadores de la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12; y el 140° aminoácido, fenilalanina, se sustituyó con serina (F140S) utilizando los cebadores de la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados se
40 muestran a continuación.

45 <SEQ ID NO: 9> 5' ATGACAACCTTCTCGTGCGCCTGGTCAGGAAATTCG 3'
<SEQ ID NO: 10> 5' CGAATTTCTGACCAGGCGCACGAGAAGTTGTCAT 3'
<SEQ ID NO: 11> 5' CGCCGCTGGGCTGTGGGGTTTAATGATGTGCGCT 3'
<SEQ ID NO: 12> 5' AGCGACATCATTAACCCACAGGCCAGCGGCG 3'
<SEQ ID NO: 13> 5' CACGTACCTCGACGCTGAGTGTCTGCTGGGCGGT 3'
<SEQ ID NO: 14> 5' ACCGCCAGCAGACACTCAGCGTCGAGGTGACGTG 3'

Se construyó un plásmido que incluía el gen *metA* (#11), que se introduce con los tres tipos de modificaciones por
50 introducción secuencial, y se denominó *pCL_Pcj1_metA* #11.

3-3. Construcción de un plásmido que expresa el gen *metX* derivado de *Deinococcus radiodurans*

El análisis por PCR se realizó usando el cromosoma de *Deinococcus radiodurans* (número de acceso: ATCC BAA-
55 816D) adquirido en Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como plantilla, junto con los cebadores de la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16, para amplificar el gen *metX* que codifica homoserina O-acetil transferasa.

Los cebadores usados en la PCR se prepararon basándose en la secuencia de nucleótidos del cromosoma (AE000513) registrado en el GenBank of the National Institutes of Health (NIH GenBank), y los cebadores de la SEQ

ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16 tienen el sitio de restricción *EcoRV* y el sitio de restricción *HindIII*, respectivamente.

<SEQ ID NO: 15> 5' AATTGATATCATGACCGCCGTGCTCGC 3'
<SEQ ID NO: 16> 5' AATTAAGCTTTCAACTCCTGAGAAACGCCCC 3'

5

El análisis por PCR se realizó por desnaturalización a 94°C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 56°C durante 30 s, y polimerización a 68°C durante 5 min; y polimerización a 68°C durante 7 min.

10 El plásmido *pCL1920* que incluía el producto de PCR obtenido de este modo y el promotor *CJ1* (patente coreana número 0620092) se clonó después del tratamiento con *EcoRV* y *HindIII*, respectivamente. *E. coli DH5α* se transformó utilizando el plásmido clonado y se obtuvo un plásmido seleccionando *E. coli DH5α* transformado de una placa LB que contenía espectinomicina (50 µg/ml). El plásmido obtenido de este modo se denominó *pCL_Pcj1_dra metX*.

15

3-4. Construcción de un plásmido que expresa el gen *metX* derivado de *Chromobacterium Violaceum*

El análisis por PCR se realizó usando el cromosoma de *Chromobacterium Violaceum* (número de acceso: ATCC 12472) adquirido en Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como plantilla, junto con los cebadores de la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 18, para amplificar el gen *metX* derivado de *Chromobacterium Violaceum*.

Los cebadores usados en la PCR se prepararon basándose en la secuencia de nucleótidos del cromosoma de *Chromobacterium Violaceum* (NC_005085) registrada en el GenBank of the National Institutes of Health (NIH GenBank), y los cebadores de la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 18 tienen el sitio de restricción *EcoRV* y el sitio de restricción *HindIII*, respectivamente.

<SEQ ID NO: 17> 5' aatt gatatc ATGACCGACACCAACTGTTCGG 3'
<SEQ ID NO: 18> 5' aatt aagctt TCATGCGTTCACCTCCTTGGC 3'

30 El análisis por PCR se realizó por desnaturalización a 94°C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 56°C durante 30 s, y polimerización a 68°C durante 2 min; y polimerización a 68°C durante 10 min.

35 El plásmido *pCL1920* que incluía el producto de PCR obtenido de este modo y el promotor *CJ1* (patente coreana número 0620092) se clonó después del tratamiento con *EcoRV* y *HindIII*, respectivamente. *E. coli DH5α* se transformó utilizando el plásmido clonado y se obtuvo un plásmido seleccionando *E. coli DH5α* transformado de una placa LB que contenía espectinomicina (50 µg/ml). El plásmido obtenido de este modo se denominó *pCL_Pcj1_cvi metX*.

40 3-5. Un plásmido para la construcción de una cepa de 2 copias para mejorar el gen de biosíntesis

(1) Construcción del vector *pSG76c* para la inserción de *ppc*

En el presente Ejemplo, se construyó *pSG76c-2ppc*, que es un vector para la inserción de ADN cromosómico de *E. coli* que incluye el gen *ppc* que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa.

La información de la secuencia de nucleótidos del gen *ppc* se obtuvo basándose en la base de datos NIH GenBank (NCBI Reg. número gi: 89110074), y los cebadores (SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 20), que incluyen el ORF de *ppc*, y los sitios de restricción *EcoRI* y *SacI* de la posición -200 del gen *ppc*, y los cebadores (SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22), que incluyen los sitios de restricción *SacI* y *KpnI*, se sintetizaron basándose en la información.

<SEQ ID NO: 19> 5' gccggaattc tgctggatgc gatacttgcg c 3'
<SEQ ID NO: 20> 5' gaaggagctc agaaaaccct cgcgcaaaag 3'
<SEQ ID NO: 21> 5' gccggagctc tgctggatgc gatacttgcg c 3'
<SEQ ID NO: 22> 5' gaagggtacc agaaaaccct cgcgcaaaag 3'

55

El análisis por PCR se realizó usando el cromosoma de *E. coli W3110* como plantilla junto con los cebadores de las SEQ ID NOS: 19 y 20 y las SEQ ID NOS: 21 y 22. Se usó la ADN polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra™* (Stratagene) como polimerasa, y la PCR se realizó por desnaturalización a 94°C durante 3 min; 30 ciclos de

desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 56°C durante 30 s, y polimerización a 68°C durante 5 min; y polimerización a 68°C durante 7 min. Como resultado, se obtuvo el gen *ppc* amplificado con un tamaño de aproximadamente 3,1 kb, incluidos los sitios de restricción *EcoRI*- y *SacI*, y el sitio de restricción *SacI*- y *KpnI*.

- 5 Después de tratar el final del gen *ppc* obtenido por PCR con *EcoRI* y *SacI*, y *SacI* y *KpnI*, el gen *ppc* resultante se ligó al vector *pSG76c* (J Bacteriol. 1997 Jul; 179 (13): 4426 - 8), que ya se trató con *EcoRI* y *KpnI*, y finalmente se construyó el vector recombinante *pSG76c-2ppc* en el que se clonaron dos copias del gen *ppc*.

(2) Construcción del vector *pSG76c* para la inserción de *aspC*

10

En el presente Ejemplo, se construyó *pSG76c-2aspC*, que es un vector para la inserción de ADN cromosómico de *E. coli* que incluye el gen *aspC* que codifica la aspartato aminotransferasa.

- La información de la secuencia de nucleótidos del gen *aspC* se obtuvo basándose en la base de datos NIH GenBank (NCBI Reg. número gi: 85674274), y los cebadores (SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24), que incluyen el ORF de *aspC* y el sitio de restricción *SacI* de la posición -200 del gen *aspC* se sintetizaron basándose en la información.

<SEQ ID NO: 23> 5' tccgagctca taagcgtagc gcatcaggca 3'

<SEQ ID NO: 24> 5' tccgagctcg tccacctatg ttgactacat 3'

20

- El análisis por PCR se realizó usando el cromosoma de *E. coli* W3110 como plantilla junto con los cebadores de oligonucleótidos de las SEQ ID NOS: 23 y 24. Se usó la ADN polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra*TM (Stratagene) como polimerasa, y la PCR se realizó por desnaturalización a 94°C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 56°C durante 30 s, y polimerización a 68°C durante 2 min; y polimerización a 68°C durante 7 min. Como resultado, se obtuvo el gen *aspC* amplificado con un tamaño de aproximadamente 1,5 kb, incluido el sitio de restricción *BamHI*.

- Después de tratar el final del gen *aspC* obtenido por PCR con *BamHI*, el gen *aspC* resultante se ligó al vector *pSG76c* (J Bacteriol. 1997 Jul; 179 (13): 4426 - 8), que ya se trató con *BamHI*, y, finalmente, se construyó el vector recombinante *pSG76c-2aspC*, en el que se clonaron dos copias del gen *aspC*.

30

(3) Construcción del vector *pSG76c* para la inserción de *asd*

- En el presente Ejemplo, se construyó *pSG76c-2asd*, que es un vector para la inserción de ADN cromosómico de *E. coli* que incluye el gen *asd* que codifica aspartato-semialdehído deshidrogenasa.

35

- La información de la secuencia de nucleótidos del gen *asd* se obtuvo basándose en la base de datos NIH GenBank (NCBI Reg. número gi: 89110578), y los cebadores (SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 26), que incluyen el ORF de *asd*, y los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* de la posición -200 del gen *asd*, y los cebadores (SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28), que incluyen los sitios de restricción *XbaI*- y *EcoRI*, se sintetizaron basándose en la información.

40

<SEQ ID NO: 25> 5' ccggaattcc caggagagca ataagca 3'

<SEQ ID NO: 26> 5' ctagtctaga tgctctattt aactcccg 3'

<SEQ ID NO: 27> 5' ctagtctaga ccaggagagc aataagca 3'

45

<SEQ ID NO: 28> 5' ccggaattct gctctattta actcccg 3'

- El análisis por PCR se realizó usando el cromosoma de *E. coli* W3110 como plantilla junto con los cebadores de oligonucleótidos de las SEQ ID NOS: 25 y 26 y las SEQ ID NOS: 27 y 28. Se usó ADN polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra*TM (Stratagene) como polimerasa, y la PCR se realizó durante 30 ciclos que consistían en desnaturalización a 96°C durante 30 s, hibridación a 50°C durante 30 s, y polimerización a 68°C durante 2 min. Como resultado, se obtuvo el gen *asd* amplificado con un tamaño de aproximadamente 1,5 kb que incluía los sitios de restricción *EcoRI*- y *XbaI* y los sitios de restricción *XbaI*- y *EcoRI*.

50

- Después de tratar el final del gen *asd* obtenido por PCR con *EcoRI* y *XbaI*, el gen *asd* resultante se ligó al vector *pSG76c*, que ya se trató con *EcoRI*, y finalmente se construyó el vector recombinante *pSG76c-2asd*, en el que se clonan dos copias del gen *asd*.

55

Ejemplo 4: Construcción de una cepa parental natural

(1) Potenciación de los genes *ppc*, *aspC*, y *asd*

- E. coli* W3110 (número de acceso: ATCC 9637) adquirido en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) se transformó con los vectores *pSG76c-2ppc*, *pSG76c-2aspC*, *pSG76c-2asd* preparados en el Ejemplo 3-5, se puso en placas en medio de placa LB-Cm (10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 10 g/l de triptona, 25 µg/l de cloranfenicol, y 15 g/l de agar), y se seleccionaron las colonias que mostraron una resistencia al cloranfenicol. Los transformantes seleccionados son las cepas, en las que el vector *pSG76c-2ppc* se insertó primero en la parte *ppc* del genoma.
- 10 La cepa obtenida de este modo, en la que se insertan 2 copias del gen *ppc*, se transformó con el vector *pST76-AsceP* que expresa *I-SceI*, que es una enzima de restricción que digiere la parte *I-SceI* presente en el vector *pSG76c*, y se puso en placas en un medio de placa LB-Ap (10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 10 g/l de triptona, 100 µg/l de ampicilina y 15 g/l de agar), y se seleccionaron las cepas que crecieron a 30°C.
- 15 Las cepas que crecieron de este modo pueden estar en un estado en el que el gen *ppc* se amplificó para tener 2 copias o se puede devolver para que tenga una sola copia. Las cepas con 2 copias del gen *ppc* con un tamaño de gen aumentado de 6,5 kb se seleccionaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1% después de realizar la PCR utilizando los cebadores de la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31. Como resultado del proceso anterior, el gen *ppc* se inserta adicionalmente mientras se elimina el vector *pSG76c*.
- 20 De acuerdo con el método descrito anteriormente, las cepas W3110 con copias amplificadas de los genes *ppc*, *asd* y *aspC* se construyeron secuencialmente utilizando los vectores *pSG76c-2aspC* y *pSG76c-2asd*. Durante el proceso, la construcción de la cepa con 2 copias del gen *aspC* se confirmó identificando el gen con un tamaño aumentado de 3,2 kb en una electroforesis en gel de agarosa al 1% después de realizar la PCR utilizando los cebadores de la SEQ ID NO: 32 y la SEQ ID NO: 33, mientras que la construcción de la cepa con 2 copias del gen *asd* se confirmó identificando el gen con un tamaño aumentado de 3,2 kb en una electroforesis en gel de agarosa al 1% después de realizar la PCR utilizando los cebadores de la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO: 35. La cepa construida de este modo se denominó *CJW2*.
- 30 <SEQ ID NO: 30> CTGGCTCAATTAATCAGGCTC
 <SEQ ID NO: 31> CGAGGGTGTAGAACAGAAAGT
 <SEQ ID NO: 32> TGGTGAACACTTTGAAGTGG
 <SEQ ID NO: 33> TGCGGCACGAGCGCCTTATCC
 <SEQ ID NO: 34> GCTCGTAGGCTAAGAAATGCC
 35 <SEQ ID NO: 35> CAGGTAAGGCTGTGAATACTC

(2) Deleción de los genes *metB*, *thrB*, y *metA*

- La cepa con deleción en los genes *metB*, *thrB* y *metA* se construyó de la misma manera que en el Ejemplo 3-1 utilizando la cepa *CJW2*, y la cepa se denominó *CJW2H*. La cepa *CJW2H* es una cepa que puede acumular de forma excesiva homoserina dentro de la cepa y producir O-acetil-homoserina u O-succinilhomoserina dependiendo de la especificidad del sustrato *metX* del plásmido que se introduce.

Ejemplo 5: Construcción de cepas experimentales

- 45 (1) Construcción de cepas

- Las cepas de *E. coli* *CJM2* y *CJW2H* construidas en los Ejemplos 1-(3) y 4-(2), respectivamente, se prepararon en células competentes y se introdujeron mediante electroporación con cuatro tipos diferentes de plásmidos, *pCL_Pcj1_metA* (*wt*), *pCL_Pcj1_metA* #11, *pCL_Pcj1_dra metX*, y *pCL_Pcj1_cvi metX*, construidos en los Ejemplos 3-1,3-2,3-3, y 3-4, respectivamente.

(2) Experimento de cultivo en matraz

- 55 Luego, se realizó una prueba en matraz para comparar los tipos de precursores de metionina y la cantidad de producción producida por cada una de las cepas, que se introdujeron con los cuatro tipos de plásmidos, respectivamente. La prueba en matraz se realizó de la siguiente manera: cada cepa se sembró en una placa LB, se cultivó en una incubadora a 31°C durante 16 horas, y se inocularon colonias individuales en 3 ml de medio LB, y se cultivaron en una incubadora a 31°C a una velocidad de 200 rpm durante 16 horas.

En un matraz de 250 ml se añadieron 25 ml de un medio productor de precursor de metionina que se muestra en la Tabla 1, y después se añadieron con 500 µl cada uno de los caldos de cultivo preparados previamente, respectivamente. Después, el matraz se incubó en una incubadora a 31°C a una velocidad de 200 rpm durante 40 horas, y se compararon los tipos y la cantidad de precursores de metionina obtenidos en cada una de las cepas introducidas con cada uno de los plásmidos. Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3 a continuación.

[Tabla 1]

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

10

[Tabla 2]

Cepa	DO	Consumo de glucosa (g/l)	Producto (g/l)	Cantidad de producto (g/l)
<i>CJM2 pCL_Pcj1_metA (wt)</i>	18,8	58,2	O-succinilhomoserina	1,2
<i>CJM2 pCL_Pcj1_metA #11</i>	18,5	68,0	O-succinilhomoserina	16,5
<i>CJM2 pCL_Pcj1_dra metX</i>	18,3	68,5	O-acetilhomoserina	13,0
<i>CJM2 pCL_Pcj1_cvi metX</i>	18,5	67,8	O-succinilhomoserina	17,2

[Tabla 3]

Cepa	DO	Consumo de glucosa (g/l)	Producto (g/l)	Cantidad de producto (g/l)
<i>CJW2H pCL_Pcj1_metA (wt)</i>	42,3	67,7	O-succinilhomoserina	0,9
<i>CJW2H pCL_Pcj1_metA #11</i>	45,3	70,0	O-succinilhomoserina	6,5
<i>CJW2H pCL_Pcj1_dra metX</i>	44,2	70,0	O-acetilhomoserina	4,2
<i>CJW2H pCL_Pcj1_cvi metX</i>	43,8	70,0	O-succinilhomoserina	6,2

Como resultado, de acuerdo con las Tablas 2 y 3, se confirmó que las cepas *CJM2 pCL_Pcj1_metA (wt)*, *CJM2 pCL_Pcj1_metA#11*, *CJW2H pCL_Pcj1_metA (wt)*, y *CJW2H pCL_Pcj1_metA #11*, que incluyen respectivamente el gen *metA* natural de *E. coli* y el gen *metA#11*, que tiene una resistencia a la retroalimentación, produjeron O-succinilhomoserina, mientras que las cepas *CJM2 pCL_Pcj1_dra metX* y *CJW2H pCL_Pcj1_dra metX*, que incluyen respectivamente el gen *metX* derivado de *Deinococcus radiodurans*, produjeron O-acetilhomoserina.

20 En el caso del gen *metX* derivado de *Chromobacterium Violaceum*, el gen tiene una alta homología con otros genes homólogos *metX* (ortólogos) en comparación con la del gen *metA*. Sin embargo, con respecto a la especificidad del sustrato, el gen es la homoserina succiniltransferasa que produce succinilhomoserina, a diferencia del gen *metX* informado en general.

25 Además, en el caso en que se introdujo el gen *metA(wt)* natural de *E. coli*, la O-succinilhomoserina se produce aproximadamente a 1 g/l debido al fenómeno de inhibición por retroalimentación por la adición de metionina a una concentración de 0,3 g/l en el medio, mientras que en el caso en que se introdujo el gen *metX* derivado de *Chromobacterium Violaceum*, se produjo O-succinilhomoserina sin el fenómeno de inhibición por retroalimentación por metionina añadida al medio, incluso por el propio tipo natural sin ninguna introducción de modificación génica.

30

La cepa *CJM2* introducida con *pCL_Pcj1_cvi metX* (*CJM2 pCL_Pcj1_cvi metX*) se depositó en el Korean Culture

Center of Microorganisms (KCCM) ubicado en 361 - 221, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, Corea, que es un filial de la Korean Federation of Culture Collections (KFCC), reconocida como una autoridad internacional de depósito en virtud del Tratado de Budapest, el 20 de junio de 2013 con el Número de Acceso KCCM11433P.

5 (3) Experimento de cultivo en fermentador grande

Para la producción a gran escala de O-succinilhomoserina, un precursor de metionina, utilizando las cepas *CJM2 pCL_Pcj1_cvi metX* y *CJW2H pCL_Pcj1_cvi metX*, se realizó un cultivo en un fermentador de 5 l.

- 10 Se inoculó un medio de placa LB que contenía un antibiótico de espectinomycin con las cepas *CJM2 pCL_Pcj1_cvi metX* y *CJW2H pCL_Pcj1_cvi metX* y se cultivó a 31°C durante una noche. Después, se inocularon colonias individuales en un medio LB de 10 ml que contenía espectinomycin, se cultivaron a 31°C durante 5 horas, y se inocularon de nuevo 2 ml del cultivo en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml que contenía 200 ml de un medio de siembra. Posteriormente, el resultado se cultivó en una incubadora a 31°C a una velocidad de 200 rpm durante 3
- 15 horas a 10 horas, y se inocularon 255 ml del cultivo de siembra en 1,7 l del medio principal del fermentador de 5 l para consumir 1,3 l del medio de siembra por el método de alimentación por lotes, y se cultivó durante 50 horas a 100 horas.

- Los detalles de los componentes del medio se muestran en la Tabla 4 a continuación. La concentración del líquido
- 20 de fermentación cultivado de este modo se analizó mediante HPLC y los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación.

[Tabla 4]

Composición	Medio de siembra	Medio principal	Medio de alimentación
Glucosa (g/l)	10,1	40	560
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/l)	0,5	4,2	
Extracto de levadura (g/l)	10	3,2	
KH ₂ PO ₄	3	3	8
Sulfato de amonio (g/l)		6,3	
NH ₄ Cl (g/l)	1		
NaCl (g/l)	0,5		
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (g/l)	5,07		
DL-metionina (g/l)		0,5	0,5
L-isoleucina (g/l)	0,05	0,5	0,5
L-treonina (g/l)		0,5	0,5

25

[Tabla 5]

	Cantidad de producción de O-succinilhomoserina (g/l)
<i>CJM2 pCL_Pcj1_cvi metX</i>	68
<i>CJW2H pCL_Pcj1_cvi metX</i>	18

Como se muestra en la Tabla 5 anterior, se confirmó que la cepa *CJM2 pCL_Pcj1_cvi metX*, en la que el gen *metX* derivado de *Chromobacterium Violaceum* se introdujo basándose en la cepa productora de treonina como cepa parental, acumula O-succinilhomoserina a un alto nivel.



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To, CJ CheilJedang Corporation
CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEOUL 100-400,
REPUBLIC OF KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Escherichia coli</i> CJM2	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM11433P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on June. 20. 2013. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong Seodaemun-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: June. 20. 2013.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form BP/4

Sole page

한국미생물보존센터

120-091 서울시 서대문구 홍제1동 361-221 유림빌딩 Tel: 02-391-0950, 396-0950 Fax: 02-392-2559 E-mail: kccm@kccm.or.kr

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

Yurim Bldg., 361-221 Hongje-1dong, Seodaemun-gu, Seoul, 120-091, Korea Tel: 82-2-391-0950, 396-0950 Fax: 82-2-392-2559 E-mail: kccm@kccm.or.kr

<110> CJ CheilJedang Corporation

5

<120> Microorganismos para la producción de O-succinil homoserina y método para la producción de O-

succinil homoserina usando los mismos

<130> OPA14140PCT

5 <150> KR 10-2013-0126602
<151> 23-10-2013

<160> 36

10 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 70

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

20 <400> 1

ttactctggt gcctgacatt tcaccgacaa agcccaggga acttcatcac gtgtaggctg
gagctgcttc 70

60

<210> 2

25 <211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> cebador

<400> 2

ttacccttg ttgcagccc ggaagccatt ttccaggctg gcaattaaat catatgaata
tcctccttag 70

60

35 <210> 3

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> cebador

<400> 3

45 aaagaatatg ccgatcggtt cgggcttagg ctccagtgcc tggcgggtg gtgtaggctg
gagctgcttc 70

60

<210> 4

50 <211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> cebador

<400> 4

agacaaccga catcgcttcc aacattggcg accggagccg ggaaggcaaa catatgaata
tcctccttag 70

60

5	<210> 5 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
10	<400> 5 caatttcttg cgtgaagaaa acgtcttgt gatgacaact tctcgtcgt gtgtaggctg gagctgctc 70	60
15	<210> 6 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
20	<400> 6 aatccagcgt tggattcatg tgccgtagat cgtatggcgt gatctggtag catatgaata tcctccttag 70	60
25	<210> 7 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 7 aattgatatc atgccgattc gtgtgccgg 29	
40	<210> 8 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
45	<400> 8 aattaagctt ttaatccagc gttggattca tgtg	34
50	<210> 9 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
55	<400> 9 atgacaactt ctcgtgcgcc tggtcaggaa attcg	35
	<210> 10 <211> 35	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador	
	<400> 10 cgaatttcct gaccaggcgc acgagaagtt gtcac	35
10	<210> 11 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 11 cgccgctggg cctggtgggg ttaatatgatg tcgct	35
25	<210> 12 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
30	<400> 12 agcgacatca ttaaacccca ccaggcccag cggcg	35
35	<210> 13 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
40	<400> 13 cacgtcacct cgacgctgag tgtctgctgg gcggt	35
45	<210> 14 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
50	<400> 14 accgccagc agacactcag cgctcagggtg acgtg	35
55	<210> 15 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> cebador	
5	<400> 15 aattgatatc atgaccgccg tgctcgc	27
	<210> 16 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
15	<400> 16 aattaagctt tcaactcctg agaaacgccc c	31
	<210> 17 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 17 aattgatatc atgaccgaca ccaactgttc gg	32
	<210> 18 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 18 aattaagctt tcatgcggtc acctccttg c	31
	<210> 19 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador	
45	<400> 19 gccggaattc tgcggatgc gatacttgcg c	31
	<210> 20 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
55	<400> 20 gaaggagctc agaaaaccct cgcgcaaaag	30

	<210> 21	
	<211> 31	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 21	
	gccggagctc tgcggatgc gatactgcg c	31
	<210> 22	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 22	
	gaagggtacc agaaaaccct cgcgcaaaag	30
	<210> 23	
25	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador	
	<400> 23	
	tccgagctca taagcgtagc gcatcaggca	30
35	<210> 24	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 24	
45	tccgagctcg tccacctatg ttgactacat	30
	<210> 25	
	<211> 27	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 25	
55	ccggaattcc caggagagca ataagca	27
	<210> 26	
	<211> 28	
	<212> ADN	

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 5
 <400> 26
 ctagtctaga tgctctattt aactcccg 28
 10
 <210> 27
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador
 <400> 27
 ctagtctaga ccaggagagc aataagca 28
 20
 <210> 28
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> cebador
 <400> 28
 ccggaattct gctctattta actcccg 27
 30
 <210> 29
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Chromobacterium Violaceum
 35
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(380)
 <223> homoserina O-succiniltransferasa
 40
 <400> 29

ES 2 717 939 T3

Met	Thr	Asp	Thr	Asn	Cys	Ser	Val	Gly	Ile	Val	Ala	Ala	Gln	Asp	Ala	1	5	10	15
Ala	Phe	Asp	Ile	Pro	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Leu	Pro	Gly	20	25	30	
Tyr	Gln	Leu	Arg	Phe	Glu	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Asn	Ala	Asp	Lys	Ser	35	40	45	
Asn	Ala	Ile	Leu	Ile	Cys	His	Ala	Leu	Ser	Gly	His	His	His	Val	Ala	50	55	60	
Gly	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Asp	Asp	Lys	Thr	Pro	Gly	Trp	Trp	Asp	Asn	Met	65	70	75	80
Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Asp	Thr	Arg	Arg	Phe	Phe	Val	Val	Gly	85	90	95	
Val	Asn	Asn	Leu	Gly	Gly	Cys	His	Gly	Ser	Thr	Gly	Pro	Ser	Ser	Val	100	105	110	
Asn	Pro	Ala	Thr	Gly	Gln	Pro	Trp	Gly	Ser	Ala	Phe	Pro	Val	Met	Thr	115	120	125	
Val	Pro	Asp	Trp	Val	Thr	Ser	Gln	Ala	Arg	Leu	Ala	Asp	Arg	Leu	Gly	130	135	140	
Ile	Glu	Arg	Trp	Ala	Ala	Val	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Gly	Gly	Met	Gln	145	150	155	160
Ala	Leu	His	Trp	Ser	Ile	Ala	Tyr	Pro	Glu	Arg	Val	Ala	His	Ala	Leu	165	170	175	
Val	Ile	Ala	Ser	Ala	Pro	Lys	Leu	Ser	Ala	Gln	Asn	Ile	Ala	Phe	Asn	180	185	190	
Asp	Val	Ala	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Thr	Asp	Pro	Asp	Phe	Cys	Gly	Gly	195	200	205	

ES 2 717 939 T3

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

<210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 30
 ctggctcaat taatcaggct c 21

<210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 31
 cgagggtgtt agaacagaag t 21

<210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

ES 2 717 939 T3

	<400> 32 tggatgaacta cttgaagtg g	21	
5	<210> 33 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> cebador		
15	<400> 33 tgcggcacga ggccttata c	21	
20	<210> 34 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> cebador		
25	<400> 34 gctcgtaggc taagaaatgc c	21	
30	<210> 35 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> cebador		
35	<400> 35 caggtgaaggc tgtgaatact c	21	
40	<210> 36 <211> 1143 <212> ADN <213> Chromobacterium Violaceum		
	<400> 36 atgaccgaca ccaactgttc ggtaggcatc gtcgcggccc aggatgccgc gttcgacatt		60
	cccctgccgc tcgccagcgg cgcgcgctg ccgggetatc agctgcgttt cgagacctac		120
	ggcaaaactca acgccgacaa gagcaacgcc atcctgatct gccacgcatt gtccggccac		180
45	caccatgtcg ccggctatta ccgcgccgac gacaagaccc cgggctggtg ggacaatatg		240

ES 2 717 939 T3

atcgccccg gcaagccgat cgacaccgc cgcttcttcg tggtcggcgt caacaacctg	300
ggcggttgcc acggcagcac cggcccgctc agcgtcaacc cggccaccgg ccagccgtgg	360
ggctcggcct ttccggtgat gacggtgccg gactgggtga cctcgcaggc ggcctggcc	420
gaccggctcg gcattgaacg ctgggcggcg gtgataggcg gctcgcctggg cggcatgcag	480
gcgctgcact ggagcatcgc ctatccgga cgcgtcgcgc acgcgctggt gatcgctcc	540
gcgccaagc tgtcggcgca gaacatcgcc ttcaacgacg tcgcgcgcca ggccatcctc	600
accgaccggg acttttgcgg cggcgacttc taccagcagg gcaccatccc ccgccggggc	660
ctcaggctgg cgcggatgct gggccacatc acctatctgt ccgacgatgg catgggcgag	720
aaattcggcc gcatgctgcg ctcgggggaa taccgcttcg gctacgacgt ggagttcgag	780
atcgagagct acctgcgcta ccaaggcgac aagtctctcg attacttcga cgccaacacc	840
tatctgctga tgaccaaggc gctggactac ttcgaccccg ccgccgcgca cggcggcgac	900
ctggccgccg cgctgaagcc ggcgcaggcg gcgttcatgg tggccagctt caccagcgac	960
tggcgcttct cgccggagcg ctcgcgcgag acggtgaagg cgctgatcgc cgccggcaag	1020
cgcgtcagct acgccgagat cgagtcggtg cacggccacg acgccttcct gatgaccgac	1080
caaccgtatg tggacctgat gcgcgcctac ctggaccgcg tggccaagga ggtgaacgca	1140
tga	1143

REIVINDICACIONES

1. Una O-succinilhomoserina que produce un microorganismo de *Escherichia sp.* que expresa un polipéptido, que tiene una resistencia a la inhibición por retroalimentación por metionina y una actividad de homoserina O-succiniltransferasa, en la que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 29.
2. El microorganismo de *Escherichia sp.* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo de *Escherichia sp.* es *Escherichia coli*.
3. El microorganismo de *Escherichia sp.* de la reivindicación 1, en el que el gen *metB* que codifica la cistationina gamma sintasa se elimina adicionalmente, o la activación de la cistationina gamma sintasa se debilita.
4. El microorganismo de *Escherichia sp.* de la reivindicación 1, en el que el gen *thrB* que codifica la homoserina cinasa y el gen *metA* que codifica la homoserina O-succiniltransferasa se eliminan adicionalmente, o la activación de la homoserina cinasa y la homoserina O-succiniltransferasa se debilita.
5. El microorganismo de *Escherichia sp.* de la reivindicación 1, en el que fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa y aspartato-semialdehído deshidrogenasa se potencian adicionalmente.
6. Un método para producir O-succinilhomoserina, que comprende:
 - (a) cultivar el microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un medio; y
 - (b) obtener O-succinilhomoserina del microorganismo o el medio.