



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 734 412**

⑮ Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2015 PCT/KR2015/005548**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15186958**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2015 E 15803800 (0)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3153575**

⑮ Título: **Microorganismo que tiene capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico, y procedimiento de producción de ácido succínico u O-succinilhomoserina mediante el uso del mismo**

⑩ Prioridad:

03.06.2014 KR 20140067787

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.12.2019

⑮ Titular/es:

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

⑮ Inventor/es:

PARK, HYE MIN;
HONG, KUK KI;
SONG, GYU HYEON;
YANG, YOUNG LYEOL;
KANG, MIN SUN;
YOON, JONG HYUN;
JUNG, BYUNG HOON y
CHOI, SU JIN

⑮ Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 734 412 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 tiene capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico, y procedimiento de producción de ácido succínico u O-succinilhomoserina mediante el uso del mismo

5

Campo técnico

El concepto inventivo se refiere a un microorganismo que tiene la capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico, y a un procedimiento de producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico mediante el uso del mismo.

10

Técnica antecedente

15

Para promover la producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico en condiciones aeróbicas, se requiere succinil-CoA como precursor. El complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa actúa como un catalizador para la deshidrogenación de α -cetoglutarato en ácido succínico en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). El gen que codifica esta enzima, *sucAB*, se expresa como un grupo en un cromosoma junto con *sdhCDAB* que codifica succinato deshidrogenasa y *sucCD* que codifica succinil-CoA sintetasa, y se sabe que esta expresión es inducida por los dos promotores incluidos en el grupo. La expresión génica en el grupo se induce principalmente por el promotor *sdhC*. En este momento, *sdhCDAB*, *sucAB* y *sucCD* se expresan en el orden establecido. El ciclo de TCA es ventajoso para la expresión de *sdhCDAB*, un gen que codifica la succinato deshidrogenasa, y en consecuencia es ventajoso para la rápida descomposición de succinil-CoA debido a la expresión promovida de succinato deshidrogenasa, incluso aunque succinil-CoA se produce por medio de la expresión de *sucAB*. El promotor de *sucA* se encuentra entre *sdhCDAB* y *sucAB* en el centro del grupo. El promotor *sucA* causa la expresión de *sucAB*, pero el promotor más importante en este grupo es *sdhC* que induce la expresión de *sdhCDAB*. El promotor *sucA* es más débil que el promotor *sdhC* (S J Park, G Chao and R P Gunsalus, J. Bacteriol. 1997; Cunningham, L. & Guest, J. R. (1998) Microbiology 144, 2113-2123). Hay un informe que demuestra que la producción de ácido succínico se incrementó al eliminar *sdhAB* en una cepa productora de ácido succínico en condiciones aeróbicas (A. Yu. Skorokhodova, et al., Applied Biochemistry and Microbiology (Bioquímica y Microbiología Aplicadas), diciembre de 2013, Vol. 49, Ejemplar 7, pp. 629-637).

20

25

30

En el curso de la investigación sobre la promoción de la producción de ácido succínico u O-succinilhomoserina, los presentes inventores desarrollaron un microorganismo capaz de promover la producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico mediante la mejora de la actividad del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa, lo que lleva a la finalización de la presente divulgación.

35

Descripción detallada del problema técnico concepto inventivo

40

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un microorganismo que produzca O-succinilhomoserina o ácido succínico.

45

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento de producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico que comprende una etapa de cultivo del microorganismo que tiene la capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico.

50

En una realización de la presente divulgación, el microorganismo que tiene la capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico puede ser un microorganismo en el que se mejora una actividad del complejo de α -cetoglutarato deshidrogenasa que un nivel de actividad endógena del mismo, promoviendo así la producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico.

55

El término "microorganismo que tiene la capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico" utilizado en la presente memoria indica un microorganismo procariota o eucariota que produce O-succinilhomoserina o ácido succínico en un cuerpo vivo y puede acumular o segregar O-succinilhomoserina o ácido succínico en el mismo. Por ejemplo, el microorganismo que tiene la capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico puede ser un microorganismo perteneciente al género *Escherichia*, el género *Erwinia*, el género *Serratia*, el género *Providencia*, el género *Corynebacteria*, el género *Pseudomonas*, el género *Leptospira*, el género *Salmonella*, el género *Brevibacterium*, el género *Hypomononas*, el género *Chromobacterium*, el género *Nocardia*, u hongos o levaduras. En una realización, el microorganismo de acuerdo con la divulgación puede ser un microorganismo que pertenece al género *Escherichia*. En una realización, el microorganismo de acuerdo con la divulgación puede ser *E. coli*.

Para promover la producción de ácido succínico y O-succinilhomoserina, se requiere succinil-CoA. La succinil-CoA se deriva de la deshidrogenación de α -cetoglutarato en el ciclo de TCA.

5 El complejo de α -cetoglutarato deshidrogenasa es una enzima catalítica que cataliza la producción de ácido succínico mediante la deshidrogenación de α -cetoglutarato en el ciclo de TCA. El complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa está compuesto de α -cetoglutarato deshidrogenasa y ácido dihidrolipoico-transferasa del grupo succinil, y está codificado por el gen sucAB (sucA No. de Acceso de GenBank BAA35392.1, sucB No. de Acceso de GenBank BAA35393.1). La α -cetoglutarato deshidrogenasa y el ácido dihidrolipoico-transferasa del grupo succinil pueden tener las secuencias de aminoácidos respectivamente establecidas en la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 24 o secuencias que tengan al menos el 70%, 80%, 90% o 95% de homología con las secuencias, que están codificadas por los genes sucA y sucB. Dichos genes pueden tener las secuencias establecidas respectivamente en la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 25 o secuencias que tengan al menos un 70%, 80%, 90% o 95% de homología con las secuencias. sucAB se expresa como un grupo con sdhCDAB y sucCD. La sdhCDAB que codifica para la succinato deshidrogenasa se expresa en gran medida debido al fuerte promotor de sdhCDAB y, por lo tanto, el ácido succínico y la succinil-CoA se descomponen rápidamente (Louise Cunningham et al., Microbiology (1998), 144, p.211-2123). Por lo tanto, la producción de ácido succínico y succinil-CoA se puede promover mediante el aumento de la producción de ácido succínico al aumentar de la actividad de la enzima.

20 El término "actividad endógena" utilizado en la presente memoria indica actividad en un microorganismo o célula original en condiciones naturales o antes de la mutación.

En una realización de la presente divulgación, el microorganismo anterior es un microorganismo que pertenece al género *Escherichia*, en el que se mejora una actividad de la homoserina O-succiniltransferasa que un nivel de actividad endógena de la misma.

25 25 La homoserina O-succiniltransferasa es una enzima que actúa como un catalizador para la producción de O-succinilhomoserina a partir de succinil-CoA y homoserina, que participa en la primera etapa de la ruta de biosíntesis de la metionina. La enzima puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 70%, 80%, 90% o 95% de homología con la secuencia, y puede estar codificada por el gen metA (No. de Acceso de GenBank BAE78015.1). El gen metA puede tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 27 o una secuencia que tenga al menos un 70%, 80%, 90% o 95% de homología con la secuencia. La expresión de este gen es inhibida por el control de retroalimentación de la metionina. Por lo tanto, un mutante diseñado para aumentar la expresión de metA mediante la eliminación del control de retroalimentación de la metionina se ha utilizado para promover la producción de metionina. La O-succiniltransferasa libre de homoserina controlada por retroalimentación con metionina puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32 o una secuencia que tenga al menos 70%, 80%, 90% o 95% de homología con la secuencia, y su gen puede estar codificado por la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 33 (metA11: Publicación de Patente Coreana No. 2009-0106365) o una secuencia que tiene al menos 80%, 90% o 95% de homología con la secuencia.

40 40 El término "homología" utilizado en relación con una secuencia utilizada en la presente memoria indica el grado de coincidencia con la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos dada, que se puede representar como un porcentaje (%). En la presente divulgación, una secuencia de homología que tiene una actividad que es idéntica o similar a la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos dada se presenta como "% de homología", que puede ser determinada fácilmente por aquellos en la técnica capaces de usar el programa informático BLAST 2.0 que calcula ciertos parámetros como puntuación, identidad y similitud.

55 55 Los términos "mejorar" o "potenciar" para la actividad enzimática utilizados en la presente memoria indican un aumento en la actividad enzimática a un nivel más alto que el de la actividad endógena, que puede resultar de la sobreexpresión de un gen que codifica una enzima o un aumento en la actividad de la enzima a un nivel más alto que el nivel de actividad endógena por mutación genética. Por ejemplo, el número de copias del gen que codifica una enzima puede aumentar, o el promotor endógeno del gen puede reemplazarse con un promotor más potente; alternativamente, una secuencia completa o una parte de la secuencia del gen o una secuencia reguladora de la expresión completa o una parte de la misma en el cromosoma puede mutarse por delección, sustitución o inserción, o por una combinación de las mismas.

60 60 El término "secuencia reguladora de expresión" utilizado en la presente memoria indica una secuencia de nucleótidos que regula la expresión génica, que es un segmento que puede aumentar o disminuir la expresión de un gen específico en un organismo, e incluye un promotor, un sitio de unión al factor de transcripción, etc, pero no limitado a los mismos.

65 En una realización de la presente divulgación, un promotor de un gen que codifica una enzima correspondiente se puede reemplazar con un promotor más potente que el promotor endógeno o el número de copias del gen se puede incrementar para aumentar la actividad enzimática correspondiente.

65 En una realización de la presente divulgación, el promotor puede ser Ptac, Ptrc, Ppro, PR, PL, Prmf o PcsK, los

cuales son bien conocidos como promotores con actividad fuerte, pero no se limita a los mismos.

En una realización de la presente divulgación, el microorganismo puede ser un microorganismo que pertenece al género *Escherichia*, en el que la actividad de una o más enzimas de la cistationina gamma-sintasa y la homoserina quinasa se debilita, en comparación con el correspondiente nivel de actividad endógena, o se elimina.

5 La cistationina gamma-sintasa cataliza la conversión de O-succinilhomoserina en cistationina. La cistationina gamma-sintasa puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28 o una secuencia que tenga al menos 70%, 80%, 90% o 95% de homología con la secuencia, y puede estar codificada por el gen metB (No. de Acceso de GenBank BAE77371.1). El gen metB puede tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 29 o una secuencia que tenga al menos un 70%, 80%, 90% o 95% de homología con la secuencia. Una vez que la actividad de esta enzima se debilita o se elimina, la O-succinilhomoserina no se convierte en cistationina o, si se convierte, la tasa de conversión es muy baja.

10 15 La homoserina quinasa actúa como un catalizador para la síntesis de O-fosfohomoserina a partir de homoserina, y puede tener la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 30 o una secuencia que tenga al menos el 70%, 80%, 90%, o 95% de homología con la secuencia y que puede estar codificada por el gen thrB (No. de Acceso de GenBank BAB96580.1). El gen thrB puede tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 31 o una secuencia que tenga al menos un 70%, 80%, 90% o 95% de homología con la secuencia. Una vez que la actividad de esta enzima se debilita o se elimina, la Ohomoserina no se convierte en O-fosfohomoserina o, si se convierte, la tasa de conversión es muy baja.

20 25 Los términos "debilitado" o "eliminado" de la actividad enzimática, utilizados en la presente memoria, indican una disminución de la expresión de un gen que codifica su enzima correspondiente a un nivel inferior al nivel endógeno o una eliminación completa de la actividad enzimática, respectivamente. Esto se puede lograr mediante la mutación de una secuencia de nucleótidos completa o una parte de una secuencia de nucleótidos, o una totalidad o una parte de una secuencia reguladora de la expresión mediante la delección, sustitución, inserción o una combinación de las mismas.

30 35 En una realización de la presente divulgación, el microorganismo puede ser *E. coli*. El microorganismo se puede diseñar para aumentar la actividad del complejo de α -cetoglutarato deshidrogenasa a un nivel más alto que el nivel endógeno y, además, para aumentar la actividad de la homoserina O-succiniltransferasa más potente a un nivel mayor que el nivel endógeno; o la actividad de una o ambas enzimas de la cistationina gamma-sintasa y la homoserina quinasa puede debilitarse hasta un nivel inferior al nivel endógeno o eliminarse.

40 45 En una realización de la presente divulgación, el microorganismo de la divulgación puede tener el gen metA en el cromosoma de *E. coli* reemplazado con el mutante metA11 (SEQ ID NO: 33, WO 2008/127240 A1) para el cual la regulación de retroalimentación mediada por metionina ha sido eliminada, puede tener genes thrB y metB eliminados del cromosoma, y se puede transformar con un vector que contiene sucAB que está bajo el control de un promotor que es más potente que su promotor original.

50 55 Un aspecto de la presente divulgación proporciona un procedimiento de producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico, el procedimiento que incluye el cultivo de un microorganismo del género *Escherichia* en un medio, en el que se mejora una actividad del complejo de α -cetoglutarato deshidrogenasa en comparación con un nivel de actividad endógena del mismo, y la recuperación de O-succinilhomoserina o ácido succínico de los medios de cultivo o el microorganismo cultivado.

60 65 En una realización de la presente divulgación, en el procedimiento de producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico, el cultivo de un microorganismo que tiene la capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico puede lograrse usando un medio apropiado y condiciones de cultivo bien conocidas por los expertos en la técnica. Este proceso de cultivo se puede regular fácilmente de acuerdo con la cepa seleccionada por los expertos en la técnica. Como ejemplos del procedimiento de cultivo, se incluyen, entre otros, el cultivo discontinuo, el cultivo continuo y el cultivo alimentado por lotes. Varios procedimientos de cultivo, incluidos los anteriores, se explican en una referencia ("Ingeniería Bioquímica" por James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp 138-176).

70 75 El medio de cultivo en la presente memoria tiene que satisfacer la condición de cultivo requerida para el cultivo de una cepa específica en la presente memoria. Varios medios de cultivo para microorganismos se describen en una referencia ("Manual de Procedimientos de Bacteriología General" por la Sociedad Americana de Bacteriología, Washington D.C., EE. UU., 1981). Estos medios incluyen varias fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y elementos traza. La fuente de carbono incluye hidratos de carbono tales como glucosa, lactosa, sacarosa, 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 palmitíco, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos como el ácido acético. La fuente de carbono puede usarse independientemente o como una combinación de al menos dos fuentes de carbono. La fuente de nitrógeno incluye fuentes de nitrógeno orgánico

como peptona, extracto de levadura, salsa, extracto de malta, licor 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 solas o en combinación. Además, se puede incluir adicionalmente una fuente de fósforo en el medio de cultivo anterior, y los ejemplos del mismo incluyen fosfato de potasio dihidrogenado, fosfato de hidrógeno dipotásico y las correspondientes sales que contienen sodio. El medio de cultivo de la presente memoria también puede contener un metal tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, el medio de cultivo puede incluir aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados.

5 Con el fin de mantener la condición aeróbica en el fluido de cultivo, se puede inyectar oxígeno o gas que contiene oxígeno (aire) en el medio de cultivo. La temperatura para el cultivo de la presente memoria es generalmente de 10 20 a 45 °C y preferentemente de 25 a 40 °C. El cultivo puede continuarse hasta que la producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico alcance un nivel deseado, y el tiempo de cultivo preferido es de 10 horas a 160 horas.

15 **Efectos ventajosos**

La cepa productora de O-succinilhomoserina o ácido succínico de acuerdo con la presente divulgación es eficaz en la producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico y puede aplicarse en diversos campos debido a las 20 posibilidades de conversión enzimática o química.

20 **Descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diagrama esquemático del vector recombinante pCL_PsucA-sucAB.

25 La Figura 2 es un diagrama esquemático del vector recombinante pCL_Prmf-sucAB.

La Figura 3 es un diagrama esquemático del vector recombinante pCL_Ptrc-sucAB.

La Figura 4 es un diagrama esquemático del vector recombinante pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB.

Modo del concepto inventivo

30 En lo sucesivo, la presente divulgación se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos únicamente tienen fines ilustrativos, y el ámbito de la presente divulgación no pretende limitarse por estos ejemplos.

35 **Ejemplo de referencia. Construcción de una cepa productora de ácido O-succinilhomoserina o ácido succínico**

1) Delección del gen metB

40 Con el fin de aumentar la acumulación de O-succinilhomoserina o ácido succínico, se construyó una cepa al delecionar el gen metB que codifica la cistationina gamma-sintasa involucrada en la degradación del precursor de la L-metionina.

45 El gen metB que codifica la cistationina gamma-sintasa en la cepa W3110 de *E. coli* (K12) de tipo salvaje se delecionó. Es bien conocido que la cistationina gamma-sintasa se une a varios precursores de metionina y, por lo tanto, puede producir varios subproductos. Por lo tanto, la sobreexpresión de la cistationina sintasa podría aumentar las reacciones secundarias para reducir la eficiencia de las reacciones intracelulares. Para delecionar el gen metB, se realizó el procedimiento de delección de PCR por FRT en un solo paso (PNAS (2000), Vol. I97, p6640-6645). Para delecionar el gen metB, se realizó la PCR con los cebadores representados por la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13 utilizando el vector pKD3 (PNAS (2000) Vol. 97, p6640-6645) como plantilla, dando como 50 resultado la construcción de un cassette de delección.

SEQ ID NO: 12;

5'-TTACTCTGGTGCCTGACATTCACCGACAAAGCCCAGGGAACTTCA

55 **TCACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'**

SEQ ID NO: 13;

60 **5'-CGCTGCGCCAGCTCCATACGCGGCACCAGCGTTCGCAACCCACGT**

AGCAGCATATGAATATCCTCCTTAG-3'

La PCR se realizó de la siguiente manera; desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, recocido a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto, con 30 ciclos realizados desde la desnaturalización hasta la extensión. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. La banda de 1,1 kb se eluyó y se purificó. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa W3110 de *E. coli* (K12) transformada previamente con el vector pKD46 (PNAS (2000) Vol. 97, p6640-6645). Para la electroporación, la cepa W3110 transformada con pKD46 se cultivó en medio LB suplementado con 200 µg/l de ampicilina y L-arabinosa 5 mM a 30 °C hasta que la OD₆₀₀ alcanzó 0,5. La cepa se lavó con glicerol al 10% tres veces. La electroporación se realizó a 2500 V. La cepa recuperada se extendió en medio de placa LB que contenía 30 µg/l de cloranfenicol, seguido de cultivo a 37 °C durante 1 a 2 días. Posteriormente, se seleccionó la cepa resistente.

La cepa seleccionada se usó luego para la PCR usando los cebadores representados por la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 15 de acuerdo con las condiciones mencionadas anteriormente.

Se observó una banda de un tamaño de 1,5 kb en un gel de agarosa al 1,0%, lo que sugiere que el gen metB se deleción.

SEQ ID NO: 14; 5'-TATTCGCCGCTCCATTCAAGC-3'
SEQ ID NO: 15; 5'-TACCCCTTGTGGCAGCCCG-3'

La cepa con el gen metB deleciónado se transformó con el vector pCP20 (PNAS (2000) vol. 97, p6640-6645), que luego se cultivó en medio LB suplementado con 100 µg/l de ampicilina. La PCR se realizó de la misma manera que se describió anteriormente y se seleccionó la cepa final con el gen metB deleciónado, que muestra una banda contraída en gel de agarosa al 1,0%. Se confirmó la deleción del marcador de cloranfenicol. La cepa auxotrófica metionina obtenida se denominó CC03-0132.

2) Deleción del gen thrB

Con el fin de aumentar la producción de O-succinil homoserina a partir de la homoserina, thrB, se deleciónó el gen que codifica la homoserina quinasa. En particular, cuando se usa una cepa productora de treonina, la deleción de este gen es necesaria porque la actividad de utilización de la homoserina es muy fuerte. Para deleciónar el gen thrB de la cepa CC03-0132 construida en 1) más arriba, se realizó el procedimiento de deleción de PCR por FRT en un solo paso (PNAS (2000) Vol. 97, p6640-6645). Para deleciónar el gen thrB, se realizó la PCR con los cebadores representados por la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 17 utilizando el vector pKD3 (PNAS (2000) Vol. 97, p6640-6645) como plantilla, dando como resultado la construcción de un cassette de deleción.

SEQ ID NO: 16;

5'-CATGGTTAAAGTTATGCCCGGCTTCCAGTGCCAATATGAGCGTC

GGGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'

SEQ ID NO: 17;

5'-GGAGATACCGCTCGCTACCGCGCCGATTCCGCGACCGCCTGCC

GCGCCTCATATGAATATCCTCCTTAG-3'

La PCR se realizó de la siguiente manera; desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, recocido a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto, con 30 ciclos realizados desde la desnaturalización hasta la extensión. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. La banda de 1,1 kb se eluyó y se purificó. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa CC03-0132 previamente transformada con el vector pKD46 (PNAS (2000) Vol. 97, p6640-6645). Para la electroporación, la cepa CC03-0132 transformada con pKD46 se cultivó en medio LB suplementado con 200 µg/l de ampicilina y L-arabinosa 5 mM a 30 °C hasta que la OD₆₀₀ alcanzó 0,5. La cepa se lavó con glicerol al 10% tres veces. La electroporación se realizó a 2500 V. La cepa recuperada se extendió en medio de placa LB que contenía 30 µg/l de cloranfenicol, seguido de cultivo a 37 °C durante 1 a 2 días. Posteriormente, se seleccionó la cepa resistente.

La cepa seleccionada procedió a la PCR usando los cebadores representados por la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19 de acuerdo con las condiciones mencionadas anteriormente. Se observó una banda de un tamaño de 1,5 kb en un gel de agarosa al 1,0%, lo que sugiere que el gen thrB se deleciónó.

SEQ ID NO: 18; 5'-ACTCGACGATCTCTTGCC-3'

SEQ ID NO: 19; 5'-ACGCCGAGAGGATCTCGCAG-3'

La cepa confirmada se transformó con el vector pCP20 (PNAS (2000) vol. 97, p6640-6645), que luego se cultivó en medio LB suplementado con 100 µg/l de ampicilina. La PCR se realizó al respecto de la misma manera que se describió anteriormente y se seleccionó la cepa final con el gen thrB delecionado, que muestra una banda más pequeña como se confirmó en electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. Se confirmó la deleción del marcador de cloranfenicol. La cepa obtenida se denominó CC03-0133.

5 3) Construcción del vector pSG para insertar metA11

La homoserina succinil transferasa está bajo control de retroalimentación por medio de metionina traza añadida al 10 medio, de modo que se inhibe la mayor parte de la actividad de la homoserina succinil transferasa. Para aumentar la producción de O-succinil homoserina, se utilizó el precursor de la L-metionina, un mutante libre de control de retroalimentación por metionina. Para reemplazar el gen metA de tipo salvaje (SEQ ID NO: 27) en el cromosoma que codifica la homoserina succinil transferasa en *E. coli* con el mutante metA11 (SEQ ID NO: 33) que está libre de control de retroalimentación por metionina, el vector de inserción pSG -metA11 fue construido. De acuerdo con 15 la instrucción proporcionada en el documento WO 2008/127240 A1, se obtuvo la información de la secuencia de nucleótidos del gen metA11 y, de acuerdo con la información, se sintetizaron los cebadores (SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21) que contenían el marco de lectura abierta (ORF) a partir del codón de inicio ATG del gen metA11 y los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, EcoRI y SacI. La PCR se realizó con los cebadores 20 representados por las siguientes secuencias utilizando la cepa metA#11 de TF4076BJF que se muestra en el documento WO 2008/127240 A1 como plantilla.

SEQ ID NO: 20; 5'-ggccgaattcatgccgattcggtgtccgga-3'
 SEQ ID NO: 21; 5'-ggccgagttcttaatccagcggtggattca-3'

25 La PCR se realizó utilizando pfu-X ADN polimerasa (Solgent, SPX16-R250) de la siguiente manera: desnaturación a 95 °C durante 30 segundos, recocido a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos, con 30 ciclos desde la desnaturación hasta la extensión. Como resultado, se obtuvo el producto de PCR en el que se amplificó el ORF metA11 que contiene los sitios de reconocimiento de EcoRI y SacI en ambos extremos. El gen metA11 obtenido por la PCR anterior se trató con las enzimas de restricción EcoRI y SacI, seguido de ligadura en el vector pSG76-C (J Bacteriol. 1997 Jul; 179 (13):4426-8.) Que también se había tratado con Enzimas de restricción EcoRI y SacI. Por último, se construyó el vector recombinante pSG-metA11 que contiene el gen metA11 clonado.

35 4) Construcción de la cepa de inserción metA11.

El vector de inserción metA11 pSG-metA11 construido en el Ejemplo de referencia 3) se introdujo en la cepa obtenida en el Ejemplo de referencia 2), seguido de cultivo en medio LB-Cm (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, cloranfenicol 30 µg/l). Posteriormente, se seleccionaron colonias resistentes al cloranfenicol. El transformante seleccionado fue la cepa primaria insertada con el vector pSG-metA11 en la posición de metA del 40 cromosoma. La cepa introducida con el gen metA11 se transformó con el vector pASceP (JOURNAL OF BACTERIOLOGY, julio de 1997, 4426-4428) expresando la enzima de restricción I-SceI para escindir el sitio I-SceI en el vector pSG. La cepa se seleccionó después de crecer en medio LB-Amp (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, cloranfenicol 100 µg/l). En la cepa seleccionada, la metA de tipo salvaje se reemplazó con metA11 y el vector pSG76-C insertado se deleciónó a partir de la misma. Esta cepa se denominó *E. coli* CC03-0038.

45 5) Construcción de una cepa productora de O-succinilhomoserina basada en una cepa productora de treonina

Se construyó una cepa que tiene la capacidad de producir ácido succínico y O-succinil homoserina por el mismo 50 procedimiento que se describe en 1) a 4) utilizando *E. coli* KCCM 10541P, la cepa de producción de treonina, descrita en la Patente Internacional WO 2005/075625, en lugar de la cepa de tipo salvaje W3110, y la cepa construida se llamó CJM2-A11.

55 **Ejemplo 1. Construcción de un plásmido para la expresión mejorada de sucAB**

1-1. Construcción de un plásmido para la expresión mejorada de sucAB con un promotor sucA

La información de la secuencia de nucleótidos del complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa codificada por sucAB (sucA No. de Acceso de GenBank BAA35392.1: SEQ ID NO: 23, sucB No. de Acceso de GenBank BAA35393.1: SEQ ID NO: 25) se obtuvo de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE. UU., basada en la cual los cebadores, representados por la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, y reconocidos por las enzimas de restricción HindIII y XbaI respectivamente y que contienen la secuencia que varía entre -188 a ATG, el codón de iniciación ORF de sucAB, se sintetizó para obtener el gen sucAB bajo el control del promotor sucA.

65 SEQ ID NO: 1; 5'-GGCCAAGCTTGCATCAGGCGTAACAAAGAA-3'

SEQ ID NO: 2; 5'-GGCCTCTAGATGTCCATCCTCAGTAATCG-3'

Utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* W3110 de tipo salvaje como plantilla, la clonación de sucAB, el gen que codifica el complejo de α -cetoglutarato deshidrogenasa, se realizó por PCR con los cebadores representados por la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2. PCR [Sambrook et al, Clonación Molecular, un Manual de Laboratorio (1989), Cold Spring Harbor Laboratories] se realizó utilizando pfu-X ADN polimerasa (Solgent, SPX16-R250) de la siguiente manera: desnaturización a 95 °C durante 30 segundos, recocido a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 5 minutos, con 30 ciclos desde la desnaturización hasta la extensión. Como resultado, se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 4,5 kb que contiene el promotor sucA, el gen sucAB y los sitios de reconocimiento de HindIII y XbaI. El producto de PCR obtenido se trató con las enzimas de restricción HindIII y XbaI. Al utilizar la ADN ligasa de T4, el producto de la PCR se ligó en el vector pCL1920 (Lerner, CG e Inouye, M., Nucl. Acids Res. (1990) 18:4631) que se había tratado previamente con las enzimas de restricción HindIII y XbaI, lo que resulta en la construcción del vector recombinante pCL PsucA-sucAB. La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra el vector recombinante pCL PsucA-sucAB.

15 **1-2. Construcción de un plásmido para la expresión mejorada de sucAB con un promotor rmf o trc**

La información de la secuencia de nucleótidos (sucA No. de Acceso de GenBank BAA35392.1: SEQ ID NO: 23, sucB No. de Acceso de GenBank BAA35393.1: SEQ ID NO: 25) del gen sucAB (el gen que codifica el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa) se obtuvo de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE. UU., de acuerdo con la cual se sintetizaron los cebadores representados por la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4 que tienen los sitios de reconocimiento de EcoRV y HindIII para obtener el gen sucAB.

25 SEQ ID NO: 3; 5'-ATCATGCAGAACAGCGCTTGAA-3'
SEQ ID NO: 4; 5'-GGCCAAGCTTGTCATCCTCAGTAATCG-3'

Utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* W3110 de tipo salvaje como plantilla, la clonación de sucAB se realizó mediante PCR con los cebadores representados por la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4. La PCR [Sambrook et al, Clonación Molecular, un Manual de Laboratorio (1989), Cold Spring Harbor Laboratories] se realizó utilizando pfu-X ADN polimerasa (Solgent, SPX16-R250) de la siguiente manera: desnaturización a 95 °C durante 30 segundos, recocido a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 5 minutos, con 30 ciclos desde la desnaturización hasta la extensión. Como resultado, se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 4,3 kb que contiene el gen sucAB y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII. El producto de PCR obtenido se trató con la enzima de restricción HindIII. Para reemplazar el promotor sucA, es decir, el promotor nativo del gen sucAB, los vectores pCL_Prmf-gfp (SEQ ID NO: 5) y pCL_Ptrc-gfp (SEQ ID NO: 6) que contienen respectivamente los promotores rmf y trc se trataron con enzimas de restricción EcoRV e HindIII, seguidas de la ligadura del producto de la PCR utilizando la ADN ligasa T4 (Roche: 10481220001). Como resultado, se construyeron los vectores recombinantes pCL_Prmf-sucAB y pCL_Ptrc-sucAB. Los vectores pCL_Prmf-gfp y pCL_Ptrc-gfp se introdujeron con el gen de la proteína de fluorescencia verde gfp para medir la potencia de los promotores rmf y trc. Mientras tanto, sucAB se ligó con la región promotora del vector, dando como resultado la construcción de un vector que contiene sucAB que se expresaría bajo el control de los promotores rmf y trc. La Figura 2 y la Figura 3 son diagramas esquemáticos que ilustran los vectores recombinantes pCL_Prmf-sucAB y pCL_Ptrc-sucAB, respectivamente.

45 **Ejemplo 2. Construcción de un plásmido para la expresión simultáneamente mejorada de sucAB y metA11**

Para sintetizar O-succinilhomoserina, se construyó un vector de expresión que expresaba sucAB y metA11 simultáneamente. La información de la secuencia de nucleótidos del gen metA11 se obtuvo con base en la secuencia de aminoácidos que codifica el mutante O-succinil transferasa de la cepa metA#11 de TF4076BJF descrita en la Publicación de Patente Internacional No. WO 2008/127240 A1 y, con base en la información de secuencia de nucleótidos, los cebadores representados por la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8 que tienen los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción EcoRV y HindIII en ambos extremos se sintetizaron para amplificar el ORF que varía de ATG a TAA del gen metA11.

55 SEQ ID NO: 7; 5'-GAGTGCGATATC atgccgattcgtgtgccggac-3'
SEQ ID NO: 8; 5'-GCACTCAAGCTT ttaatccagcggtggatacatg-3'

Utilizando TF4076BJF metA#11 como plantilla, la PCR se realizó con los cebadores representados por la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8. La PCR se realizó utilizando la pfu-X ADN polimerasa (Solgent, SPX16-R250) de la siguiente manera: desnaturización a 95 °C durante 30 segundos, recocido a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto, con 30 ciclos desde la desnaturización hasta la extensión. El producto de PCR obtenido se trató con las enzimas de restricción EcoRV y HindIII. El vector pCL_Pcysk-gfp (SEQ ID NO: 9) se trató con las enzimas de restricción EcoRV e HindIII, seguido de ligadura utilizando la ADN ligasa T4 (Roche: 10481220001). Como resultado, se construyó el vector recombinante pCL_Pcysk-metA11. Para insertar sucAB en el vector construido anteriormente, se sintetizaron los cebadores representados por la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID

NO: 11 que tienen el sitio de reconocimiento de HindIII.

SEQ ID NO: 10; 5'-GGCCAAGCTTGCATCAGCGTAACAAAGAA-3'
 SEQ ID NO: 11; 5'-GGCCAAGCTTGTCCATCCTCAGTAATCG-3'

5 Para expresar metA11 y sucAB simultáneamente, se construyó el vector pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB. Primero, utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* W3110 de tipo salvaje como plantilla, se realizó la PCR con los cebadores representados por la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11. PCR [Sambrook et al, Clonación Molecular, un Manual de Laboratorio (1989), Cold Spring Harbor Laboratories] se realizó utilizando pfu-X ADN polimerasa (Solgent, SPX16-R250) de la siguiente manera: desnaturación a 95 °C durante 30 segundos, recocido a 55 °C 10 durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 5 minutos, con 30 ciclos desde la desnaturación hasta la extensión. Como resultado, se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 4,5 kb con PsucA-sucAB que incluye el sitio de reconocimiento de HindIII. El producto de PCR obtenido se trató con la enzima de restricción HindIII, seguida de ligadura, utilizando la ADN ligasa de T4 (Roche: 10481220001), en el vector pCL_Pcysk-metA11 que se había tratado previamente con la enzima de restricción HindIII. Como resultado, se construyó el 15 vector recombinante pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB. La Figura 4 es un diagrama esquemático que ilustra el vector recombinante pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB.

20 **Ejemplo 3. Fermentación para la producción de ácido succínico.**

El cultivo en matraz se realizó para investigar la producción de ácido succínico cuando la actividad de solo sucAB se incrementó en la cepa productora de O-succinilhomoserina construida en el Ejemplo de referencia. La cepa del Ejemplo de referencia 4), CC03-0038, y la cepa del Ejemplo de referencia 5), CJM2-A11, se transformaron con los plásmidos construidos en el Ejemplo 1, pCL_PsucA-sucAB, pCL_Prmf-sucAB y pCL_Ptrc-sucAB. Las cepas se extendieron en un medio de placa LB que contenía espeptinomicina, dando como resultado cepas insertadas con sucAB. Como controles, se prepararon las cepas CC03-0038 y CJM2-A11 introducidas con el vector pCL1920. El vector pCC1BAC-scrO (SEQ ID NO: 34) que tiene la secuencia scrO del plásmido pUR 400 que se origina a partir de la cepa de salmonela descrita en la Publicación de Patente Internacional No. WO 10/101360 se introdujo en estas cepas para hacer que utilicen azúcar en bruto como fuente de carbono. Las cepas resultantes se cultivaron 30 en el medio que tiene la composición mostrada en la Tabla 2 a continuación para la evaluación de la producción de ácido succínico.

35 Cada cepa se inoculó en el medio y se cultivó a 33 °C durante la noche. Se inoculó una única colonia en 2 ml de medio LB que contenía espeptinomicina, seguido de cultivo a 33 °C durante 2 horas. La cepa se inoculó de nuevo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 25 ml de medio de matraz con una densidad de OD₆₀₀ = 0,5, seguido de cultivo a 33 °C a 200 rpm durante 33 horas. Se realizó una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para investigar la producción de ácido succínico. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

40 Como resultado, a medida que se incrementaba la expresión de sucAB, aumentaba la producción de ácido succínico. Este resultado indica que la expresión mejorada de sucAB tiene el efecto de regular a la baja el glutamato, pero aumenta el flujo de succinil-CoA para aumentar la producción de ácido succínico. Cuando se usó la glucosa como fuente de carbono, la producción de ácido succínico aumentó en un 30% como máximo. Se esperaba que la producción de ácido succínico aumentara aún más a medida que la síntesis de ácido succínico 45 aumentara en una cepa en condiciones aeróbicas. Cuando se usaba azúcar en bruto como fuente de carbono, la producción de ácido succínico aumentaba tanto como cuando se usaba glucosa como fuente de carbono. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

50 **Tabla 1. Composición del medio en matraz de glucosa**

Composición	Sol. madre	Cono (por litro)	Vol (ml)
Glucosa		40 g	200
KH ₂ PO ₄		2 g	100
Sulfato de amonio		17 g	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O		1 g	
Extracto de levadura		2 g	
Metionina		0,4 g	
Treonina		1 g	
MnSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/ml	0,01 g (sol. madre 1 ml)	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 mg/ml	0,01 g (sol. madre 10 ml)	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/ml	10 mg (sol. madre 1 ml)	
Carbonato de calcio		30 g	200

Tabla 2. Composición del medio en matraz de azúcar en bruto

5	Composición	Sol. madre	Cono (por litro)	Vol (ml)
Azucar en bruto		60g	200	
KH_2PO_4		2 g	100	
Sulfato de amonio		25g	500	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		1 g		
Extracto de levadura		2 g		
metionina		0,4 g		
treonina		1 g		
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/ml	0,01 g (sol. madre 1 ml)		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/ml	0,01 g (sol. madre 10 ml)		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/ml	10 mg (sol. madre 1 ml)		
Carbonato de calcio		30 g	200	

Tabla 3. Producción de ácido succínico mediante cultivo en matraz utilizando glucosa

25	Cepa	Glucosa (g/l)	Ácido O-succínico (g/l)	O-succinil homoserina (g/l)	Glutamato (g/l)
CC03-0038/pCL1920	40	0,30	4,5	1,87	
CC03-0038/pCL_PsucA-sucAB	40	0,63	4,9	0,0	
CC03-0038/pCL-Prmf-sucAB	40	0,88	5,2	0,0	
CC03-0038/pCL_Ptrc-sucAB	40	0,93	5,5	0,0	
CJM2-A11/pCL1920	40	0,012	10,9	0,84	
CJM2-A11/pCL_PsucA- sucAB	40	0,26	11,5	0,0	
CJM2-A11/pCL-Prmf-sucAB	40	0,63	12,1	0,0	
CJM2-A11/pCL_Ptrc-sucAB	40	0,77	12,5	0,0	

Tabla 4. Producción de ácido succínico mediante cultivo en matraz utilizando azúcar en bruto

45	Cepa	Azucar en bruto (g/l)	Ácido O-succínico (g/l)	O-succinil homoserina (g/l)	Glutamato (g/l)
CC03-0038/pCC1BAC-scrO/pCL1920	60	0,24	7,0	1,33	
CC03-0038/pCC1 BAC-scrO/pCL_PsucA-sucAB	60	0,312	7,5	0	
CC03-0038/pCC1 BAC-scrO/pCL_Prmf-sucAB	60	0,762	7,9	0	
CC03-0038/pCC1 BAC-scrO/pCL_Ptrc-sucAB	60	1,56	8,2	0	
CJM2-A11/pCC1BAC-scrO/pCL1920	60	0,023	15,7	0,77	
CJM2-A11/pCC1BAC-scrO/pCL_PsucA-sucAB	60	0,22	16,1	0	
CJM2-A11/pCC1BAC-scrO/pCL-Prmf-sucAB	60	0,53	16,7	0	
CJM2-A11/pCC1BAC-scrO/pCL_Ptrc-sucAB	60	1,07	17,0	0	

Ejemplo 4. Fermentación para la producción de O-succinil homoserina.

5 Para mejorar la expresión de los genes sucAB y metA juntos en las cepas CC03-0038 y CJM2-A11, las cepas se transformaron con el plásmido pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB construido en el Ejemplo 2, seguido de un cultivo en un matraz Erlenmeyer para investigar la producción de O-succinil homoserina. La composición del medio del matraz fue como se muestra en la Tabla 1. La expresión aumentada del gen metA11 en el Ejemplo de Referencia 4) estaba bajo el control del promotor original. Por lo tanto, para mejorar su expresión, se clonó metA11 en un vector donde podría ser expresado por el promotor cysK, en el que la expresión de sucAB fue inducida simultáneamente.

10 El CC03-0038 se transformó con el plásmido pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB construido en el Ejemplo 2. La cepa se extendió sobre el medio de la placa LB que contenía espeptinomicina, dando como resultado la preparación de la cepa transformada. En cuanto a los controles, CC03-0038 y CJM2-A11 se transformaron con el vector pCL1920. Se construyó una cepa que podía usar azúcar en bruto como fuente de carbono introduciendo el vector pCC1BAC-scrO que tiene la secuencia scrO del plásmido pUR 400 que se origina a partir de la cepa de salmonela descrita en la Solicitud de Patente Coreana No. 2009-0018128 en las cepas. La cepa se cultivó en el medio de matraz de azúcar en bruto que tiene la composición mostrada en la Tabla 2 para la evaluación de la producción de O-succinil homoserina. Para fines de evaluación, algunas de las cepas descritas anteriormente se inocularon en el medio y se cultivaron a 33 °C durante la noche. Se inoculó una única colonia en 2 ml de medio LB que contenía espeptinomicina, seguido de cultivo a 33 °C durante 2 horas. Las cepas se inocularon de nuevo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 25 ml de medio de matraz con una densidad de $OD_{600} = 0,5$, seguido de cultivo a 33 °C a 200 rpm durante 33 horas. Se realizó HPLC para investigar la producción de O-succinilhomoserina. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

15 25 Los resultados indicaron que, en una cepa introducida con pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB, la O-succinilhomoserina estaba regulada ascendentemente. El rendimiento de producción se incrementó en aproximadamente un 40% en comparación con el control. A medida que aumentaba la O-succinilhomoserina, el glutamato y la homoserina se regulaban edscendentemente. Los resultados indican que la expresión mejorada de sucAB juega un papel importante en el suministro de succinil-CoA. Cuando la expresión de metA, utilizando succinil-CoA como sustrato, se mejoró simultáneamente, la concentración de O-succinilhomoserina aumentó 30 rápidamente.

Tabla 5. Producción de O-succinilhomoserina mediante cultivo en matraz utilizando glucosa

35	Cepa	O-succinil homoserina (g/l)	Glutamato (g/l)	Homoserina (g/l)
	CC03-0038/pCL1920	4,5	1,87	0,4
	CC03-0038/pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB	6,31	0,0	0,17
40	CJM2-A11/pCL1920	10,9	0,84	1,1
	CJM2-A11/pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB	15,8	0,0	0,5

Tabla 6. Producción de O-succinilhomoserina mediante cultivo en matraz utilizando azúcar en bruto

45	Cepa	O-succinil homoserina (g/l)	Glutamato (g/l)	Homoserina (g/l)
	CC03-0038/pCC1 BAC-scrO/pCL1920	7,0	1,87	0,7
50	CC03-0038/pCC1 BAC-scrO/pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB	12,4	0,0	0,23
	CJM2-A11/pCC1BAC-scrO/pCL1920	15,7	0,84	1,5
55	CJM2-A11/pCC1BAC-scrO/pCL_Pcysk-metA11_Pna-sucAB	22,6	0,0	0,54

60 65 Cuando un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* se transformó con un vector que contenía sucAB de acuerdo con una realización de la presente divulgación para mejorar la expresión de sucAB, se incrementó la producción de succinil-CoA y ácido succínico. Por lo tanto, la expresión mejorada de sucAB se puede aplicar a aquellos microorganismos que tienen el mismo ciclo de TCA con respecto al metabolismo central del carbono que el anterior, por ejemplo, a aquellos microorganismos como la levadura y *Actinomyces*, etc.

La cepa diseñada C03-0038/pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB confirmó que es capaz de producir O-succinilhomoserina, se denominó CC03-0157 y se depositó el día 22 de noviembre de 2013 en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) bajo el Tratado de Budapest (No. de Acceso: KCCM11488P).

5 **Texto libre de listado de secuencias**

Las secuencias representadas por la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 34 descritas en la presente memoria se muestran en la lista de secuencias adjunta.

10 <110> CJ CHEILJEDANG Corporation
 <120> Microorganismo capaz de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico y procedimiento de producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico

15 <130> PN103856
 <160> 34
 <170> KopatentIn 2.0

20 <210> 1
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Cebador directo para Psuc_sucAB
 <400> 1
 ggccaagctt gcatcaggcg taacaaagaa 30

30 <210> 2
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cebador directo para Psuc_sucAB
 <400> 2
 ggcctctaga tgtccatcct tcgtaatcg 30

40 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Cebador directo para sucAB
 <400> 3
 atcatgcaga acagcgcttt gaa 23

50 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Cebador directo para sucAB
 <400> 4
 ggccaagctt tgtccatcct tcgtaatcg 30

60 <210> 5

<211> 5545
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> pCL_Prmf-gfp

<400> 5
 atcgaatcaa agctgccgac aacacgggag ccagtgacgc ctcccgtggg gaaaaaatca 60
 10 tggcaattct ggaagaaaata gcgcatttcag ccggcaaaacc ggctgaagcc ggatctgcga 120
 ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgtggga 180
 15 attaattccc ctgctcgcgc aggctgggtg ccaagctctc ggtaacatc aaggcccgt 240
 ccttggagcc cttgcctcc cgacgatga tcgtgccgtg atcgaaatcc agatcctga 300
 20 cccgcagttg caaaccctca ctgatccgca tgcccggttcc atacagaaga tgggcaaca 360
 aacgatgctc gccttccaga aaaccgagga tgcgaaccac ttcatccggg gtcagcacca 420
 ccggcaagcg ccgcgacggc cgaggtcttc cgatctcctg aagccagggc agatccgtgc 480
 25 acagcacctt gccgtagaag aacagcaagg ccgccaatgc ctgacgatgc gtggagaccg 540
 aaaccttgcg ctgcgtcgcc agccaggaca gaaatgcctc gacttcgtg ctgccaagg 600
 30 ttgcgggtg acgcacacccg tggaaacgga tgaaggcacg aacccagtgg acataagcct 660
 gttcgggtcg taagctgtaa tgcaagttagc gtatgcgtc acgcaactgg tccagaacct 720
 tgaccgaacg cagcgggtggt aacggcgcag tggcggtttt catggcttgc tatgactgtt 780
 35 ttttgggtt acagtctatg cctcgccat ccaagcagca agcgcgttac gccgtgggtc 840
 gatgtttgat gttatggagc agcaacgatg ttacgcagca gggcagtcgc cctaaaacaa 900
 40 agttaaacat catgaggaa gcggtgatcg ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag 960
 ttggcgtcat cgagcgccat ctgcgacccga cggtgcgtgc cgtacatttgc tacggctccg 1020
 45 cagtgatgg cggcctgaag ccacacagtg atattgattt gtcgggttac gtcggcttac 1080
 ggcttgcgtga aacaacgcgg cgagcttgc tcaacgaccc ttggaaact tcggcttccc 1140
 ctggagagag cgagattctc cgcgtgttag aagtcaccat ttgtgtgcac gacgacatca 1200
 50 ttccgtggcg ttatccagct aagcgcaac tgcaatttgg agaatggcag cgcaatgaca 1260
 ttcttcgagg tatcttcgag ccagccacga tcgacattga tctggctatc ttgtgcacaa 1320
 55 aagcaagaga acatagcggtt gccttggtag gtccagcggc ggaggaactc tttgatccgg 1380
 ttctgaaca ggatctatgg gaggcgctaa atgaaacctt aacgctatgg aactcgccgc 1440
 ccgactgggc tggcgatgag cggaaatgttag tgcttacgtt gtcccgatt tggcacagcg 1500
 60 cagtaaccgg caaaatcgcg ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaatg gagcgcctgc 1560

	cggcccagta tcagccgtc atacttgaag ctagacaggc ttatcttggcaagaagaag	1620
	atcgcttggc ctcgcgcga gatcagttgg aagaatttgc ccaactacgtaaaggcgaga	1680
5	tcaccaaggta agtcggcaaa taatgtctaa caattcggtc aagccgacgc cgcttcgcgg	1740
	cgccggcttaa ctcaagcggtt agatgcacta agcacataat tgctcacagc caaactatca	1800
10	ggtcaagtct gcttttatta ttttaagcg tgcataataa gccctacaca aattgggaga	1860
	tatatcatga aaggctggct ttttcttgc ttcgcaatag ttggcgaagt aatcgcaaca	1920
	tccgcattaa aatctagcga gggctttact aagctcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg	1980
15	gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg	2040
	tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcattc aggcgccatt cgccattcag	2100
20	gctgcgcaac tggggaaag ggcgatcggt gcgggcctct tcgctattac gccagctggc	2160
	gaaaggggga tggctgcaaa ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg	2220
25	acgttgtaaa acgacggcca gtgaattcga gctcggtacc caggaagccg cttctattgc	2280
	acaagagata aagcgtctac cttattata aagatttgc aatataaccg tctccgtat	2340
	gttgcctgag gcgggttttt tggctctaact gtcggaaaa atttggcctt cttcacattt	2400
30	tttgcataac cgacatgccc gttagctca caaatatgac agtggcgtga attttgcga	2460
	ttgacggcag ttatgattcg cggattgtct taactgtatg tgcacattt gtaatcactg	2520
35	ttttcttttc caccagaaac cagttatgagg gaaagatatac atgagtaaag gagaagaact	2580
	tttcactgga gttgtccaa ttcttgcgttga attagatggt gatgttaatg ggcacaaatt	2640
	ttctgtcagt ggagaggggtg aaggtgatgc aacatacggaa aaacttaccc ttaaatttat	2700
40	ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt gtcactactt tctcttatgg	2760
	tgttcaatgc tttcccggtt atccggatca tatgaaacgg catgactttt tcaagagtgc	2820
45	catgccccaa ggttatgtac aggaacgcac tatatcttc aaagatgacg ggaactacaa	2880
	gacgcgtgct gaagtcaagt ttgaaaggta tacccttgcatt aatcgatcg agttaaaagg	2940
	tattgatttt aaagaagatg gaaacattct cggacacaaa ctcgagtaca actataactc	3000
50	acacaatgta tacatcacgg cagacaaaca aaagaatgga atcaaagcta acttcaaaat	3060
	tcgcccacaac attgaagatg gatccgttca actagcagac cattatcaac aaaatactcc	3120
55	aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac ctgtcgacac aatctgcctt	3180
	ttcgaaagat cccaacgaaa agcgtgacca catggcctt cttgagtttgc taaactgctgc	3240
60	tgggattaca catggcatgg atgagctcta caaataactg caggcatgca agcttggcgt	3300
	aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacacatt ccacacaaca	3360
	tacgagccgg aagcataaag tgtaaaggctt ggggtgccta atgagtgagc taactcacat	3420
65	taattgcgtt ggcgtcactg cccgctttcc agtcggaaaa cctgtcggtgc cagctgcatt	3480

5	aatgaatcgg ccaacgcgaa ttcccgacag taagacgggt aagcctgttgcgataccgc tgccttactg ggtgcattag ccagtctgaa tgacctgtca cgggataatc cgaagtggc agactggaaa atcagagggc aggaactgct gaacagcaaa aagtcagata gcaccacata gcagacccgc cataaaaacgc cctgagaagc ccgtgacggg ctttcttgc attatggta gttccttgc atgaatccat aaaaggcgcc ttagtgccat tttacccca ttcactgcca gagccgtgag cgcagcgaac tgaatgtcac gaaaaagaca gcgactcagg tgcctgtatgg tcggagacaa aaggaatatt cagcgatttgc cccgagcttgc cgagggtgct acttaagcct ttagggtttt aaggctgtt ttgttagagga gcaaacagcg tttgcgacat cttttgtaa tactgcggaa ctgactaaag tagtgagtt tacacagggc tgggatctat tcttttattc ttttttattt ctttctttat tctataaatt ataaccactt gaatataaac aaaaaaaaca cacaaaggc tagcggaaatt tacagagggt ctagcagaat ttacaagttt tccagcaaag gtctagcaga attacagat acccacaact caaaggaaaa ggacttagtaa ttatcattga ctagcccatc tcaattggta tagtgattaa aatcaccttag accaatttgag atgtatgtct gaattagtttgc aatgaacta gcgatttagc gctatgactt aacggagcat gaaaccaagc taattttatc ctgtgtggca ctactcaacc ccacgattga aaaccctaca aggaaaagac ggacggtatac gttcaattt aaccaatacg ctcagatgtatgacatca aggaaaaatg cttatgggtt attagctaaa gcaaccagag agctgatgac gagaactgtg gaaatcagga atcctttgtt taaaggctt gagattttcc agtggacaaa ctatgccaag ttctcaagcg aaaaattttaga attagttttt agtgaagaga tattgccttta tctttccag ttaaaaaat tcataaaata taatctggaa catgttaatgtt ctttgaaaaa caaatactct atgaggattt atgagtggtt attaaaagaa ctaacacaaa agaaaactca caaggcaaatt atagagatta gccttgatga atttaagttc atgttaatgc ttgaaaataa ctaccatgag tttaaaaaggc ttaaccaatg gttttgaaa ccaataagta aagatttaaa cacttacagc aatatgaaaat tggtggttga taagcgaggc cggccgactg atacgttgcatttcaagtt gaactagata gacaaatgga tctcgtaacc gaacttgaga acaaccagat aaaaatgaaat ggtgacaaaatccacacac cattacatca gattcctacc tacataacgg actaagaaaa acactacacg atgctttaac tgcaaaaattt cagctcacca gtttgaggc aaaatttttgc atgacatgc aaagtaagta tgatctcaat gtttcgttct catggctcac gcaaaaacaa cgaaccacac tagagaacat actggctaaa tacggaagga tctgagggttgc ttatggctct tgtatctatc agtgaagcat caagactaac aaacaaaatg agaacaactg ttcaccgtt catatcaaag ggaaaactgtt ccatatgcac agatgaaaaac ggtgtaaaaa agatagatac 55	3600
10	3660	
15	3720	
20	3780	
25	3840	
30	3900	
35	3960	
40	4020	
45	4080	
50	4140	
55	4200	
60	4260	

	atcagagctt ttacgagttt ttgggtcatt caaagctgtt caccatgaac agatcgacaa	5400
	tgttaacagat gaacagcatg taacacctaa tagaacaggt gaaaccagta aaacaaagca	5460
5	actagaacat gaaattgaac acctgagaca acttggtaa gctcaacagt cacacataga	5520
	cagcctgaaa caggcgatgc tgctt	5545
10	<210> 6	
	<211> 5727	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> pCL_Ptrc-gfp	
	<400> 6	
	tttctttatt ctataaatta taaccacttg aatataaaaca aaaaaaaacac acaaaggct	60
20	agcggaaattt acagagggtc tagcagaatt tacaagttt ccagcaaagg tctagcagaa	120
	tttacagata cccacaactc aaaggaaaag gactagtaat tatcattgac tagccatct	180
25	caattggat agtgattaaa atcacctaga ccaattgaga tgtatgtctg aattagttgt	240
	tttcaaagca aatgaactag cgattagtcg ctatgactta acggagcatg aaaccaagct	300
	aattttatgc tgtgtggcac tactcaaccc cacgattgaa aaccctacaa ggaaagaacg	360
30	gacggtatcg ttcaactata accaatacgc tcagatgatg aacatcagta gggaaaatgc	420
	ttatggtgta ttagctaaag caaccagaga gctgatgacg agaactgtgg aaatcaggaa	480
35	tcctttggtt aaaggcttg agattttcca gtggacaaac tatgccaagt tctcaagcga	540
	aaaattagaa ttagtttta gtgaagagat attgccttat cttttccagt taaaaaaatt	600
	cataaaatat aatctgaaac atgttaagtc tttgaaaac aaataactcta tgaggattta	660
40	tgagtggta ttaaaaagaac taacacaaaa gaaaactcac aaggcaaata tagagattag	720
	ccttgatgaa tttaagttca tggtaatgct tgaaaataac taccatgagt ttaaaaaggct	780
45	taaccaatgg gtttgaaac caataagtaa agatttaaac acttacagca atatgaaatt	840
	ggtggttgat aagcgaggcc gcccgactga tacgttgatt ttccaagttg aactagatag	900
50	acaaatggat ctcgttaaccg aacttgagaa caaccagata aaaatgaatg gtgacaaaat	960
	accaacaacc attacatcag attcctacct acataacgga ctaagaaaaa cactacacga	1020
	tgctttaact gcaaaaattc agtcaccag ttttgaggca aaatttttga gtgacatgca	1080
55	aagtaagtat gatctcaatg gttcggttctc atggctcacg caaaaacaac gaaccacact	1140
	agagaacata ctggctaaat acggaaggat ctgagggtct tatggcttctt gtatctatca	1200
60	gtgaagcatc aagactaaca aacaaaagta gaacaactgt tcaccgttac atatcaaagg	1260
	gaaaactgtc catatgcaca gatgaaaacg gtgtaaaaaa gatagataca tcagagctt	1320

	tacgagttt tggcattc aaagctgttc accatgaaca gatcgacaat gtaacagatg	1380
	aacagcatgt aacacctaata agaacaggta aaaccagtaa aacaaagcaa ctagaacatg	1440
5	aaattgaaca cctgagacaa cttgttacag ctcaacagtc acacatagac agcctgaaac	1500
	aggcgatgct gcttatcgaa tcaaagctgc cgacaacacg ggagccagtg acgcctcccg	1560
10	tggggaaaaa atcatggcaa ttctggaaga aatagcgctt tcaagccggca aaccggctga	1620
	agccggatct gcgattctga taacaaacta gcaacaccag aacagcccgt ttgcggcag	1680
	caaaacccgt gggaaattaat tcccctgctc ggcaggctg ggtgccaagc tctcggtaa	1740
15	catcaaggcc cgatccttgg agcccttgcc ctcccgacg atgatcgtgc cgtgatcgaa	1800
	atccagatcc ttgacccgca gttgcaaacc ctcactgatc cgcatgccc ttccatacag	1860
20	aagctggcg aacaaacgat gctgccttc cagaaaacccg aggatgcgaa ccacttcatc	1920
	cggggtcagc accacccggca agcgccgcga cggccgaggt cttccgatct cctgaagcca	1980
	ggcagatcc gtgcacagca cttgcccgt aagaacacgc aaggccgcca atgcctgacg	2040
25	atgcgtggag accgaaacct tgcgctcgat cgcaggccag gacagaaatg cctcgacttc	2100
	gctgctgccc aaggttgcg ggtgacgcac accgtggaaa cggatgaagg cacgaaccca	2160
30	gtggacataa gcctgttcgg ttctgtaagct gtaatgcaag tagcgtatgc gtcacgcaa	2220
	ctggtccaga accttgaccg aacgcagcgg tggtaacggc gcagtggcgg ttttcatggc	2280
	ttgttatgac tgttttttg ggttacagtc tatgcctcgg gcatccaagc agcaagcgcg	2340
35	ttacgcccgtg ggtcgatgtt tgcgttatg gaggcagcaac gatgttacgc agcagggcag	2400
	tcgcctaaa acaaagttaa acatcatgag ggaagcggtg atcgccgaag tatcgactca	2460
40	actatcagag gtagttggcg tcatcgagcg ccatctcgaa ccgcacgttgc tggccgtaca	2520
	tttgtacggc tccgcagtgg atggccgcct gaagccacac agtgcatttgc atttgcgtgt	2580
	tacggtgacc gtaaggctt atgaaacaac gggcgagct ttgtatcaacg acctttggaa	2640
45	aacttcggct tcccctggag agagcgagat tctccgcgt gtagaagtca ccattgttgt	2700
	gcacgcacgc atcattccgt ggcgttatcc agctaagcgc gaactgcaat ttggagaatg	2760
50	gcagcgcaat gacattctt caggtatctt cgagccagcc acgatcgaca ttgatctggc	2820
	tatcttgcgt aaaaaagcaa gagaacatag cgttgccttgc gtaggtccag cggcggagga	2880
55	actctttgat ccggttcctg aacaggatct atttgcggcgt ctaaatgaaa ccttaacgct	2940
	atgaaactcg ccgcccgcact gggctggcga tgagcgaaat gtagtgccta cgttgcctcg	3000
	catttggtagc agcgcaat cggcaaaat cgcgcgaag gatgtcgctg ccgactggc	3060
60	aatggagcgc ctgcccggcc agtacgcgc cgtcataactt gaagctagac aggcttatct	3120
	tggacaagaa gaagatcgct tggcctcgcc cgcagatcag ttggaagaat ttgtccacta	3180
65	cgtgaaaggc gagatcacca aggtagtcgg caaataatgt ctaacaattc gttcaagccg	3240

	acggccgcttc	gcggcgccgc	ttaactcaag	cgttagatgc	actaagcaca	taattgctca	3300
	cagccaaact	atcaggtcaa	gtctgctttt	attattttta	agcgtgcata	ataagcccta	3360
5	cacaattgg	gagatatac	atgaaaggct	ggcttttct	tgttatcgca	atagttggcg	3420
	aagtaatcgc	aacatccgca	ttaaaatcta	gcgagggctt	tactaagctc	gtcagcgggt	3480
10	gttggcgggt	gtcggggctg	gcttaactat	gcggcatcag	agcagattgt	actgagagtg	3540
	caccatatgc	ggtgtgaaat	accgcacaga	tgcgttaagga	gaaaataccg	catcaggcgc	3600
15	cattcgccat	tcaggctgctg	caactgttgg	gaagggcgat	cggtgcgggc	ctcttcgcta	3660
	ttacgcccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	aacgcacaggg	3720
20	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgaat	tcgagctcgg	tacccgcttg	3780
	ctgcaactct	ctcagggcca	ggcggtaag	ggcaatcagc	tgttgcggcgt	ctcaactggtg	3840
25	aaaagaaaaaa	ccaccctggc	gccaaatacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttggccgat	3900
	tcattaatgc	agctggcacg	acaggttcc	cgactggaaa	gcgggcagtg	agcgcaacgc	3960
30	aattaatgta	agttagcgcg	aattgatctg	gtttgacagc	ttatcatcga	ctgcacggtg	4020
	caccaatgct	tctggcgtca	ggcagccatc	ggaagctgtg	gtatggctgt	gcaggtcgta	4080
35	aatcaactgca	taattcgtgt	cgctcaaggc	gcactcccgt	tctggataat	gtttttgctg	4140
	ccgacatcat	aacggttctg	gcaaataattc	tgaaatgagc	tgttgacaat	taatcatccg	4200
40	gctcgtataa	tgtgtgaaat	tgtgagcgga	taacaatttc	acacaggaaa	gatatcatga	4260
	gtaaaggaga	agaacttttc	actggagttg	tcccaattct	tgttgaatta	gatggtgatg	4320
45	ttaatggca	caaattttct	gtcagtgag	agggtgaagg	tgtgcaaca	tacggaaaac	4380
	ttacccttaa	atttatttgc	actactggaa	aactacctgt	tccatggcca	acacttgtca	4440
50	ctactttctc	ttatgggttt	caatgctttt	cccgatatcc	ggatcatatg	aaacggcatg	4500
	acttttcaa	gagtgccatg	cccgaaagggtt	atgtacagga	acgcactata	tcttcaaag	4560
55	atgacggaa	ctacaagacg	cgtgctgaag	tcaagttga	aggtgataacc	tttgtaatc	4620
	gtatcgagtt	aaaaggattt	gatttaaag	aagatggaaa	cattctcgga	cacaaactcg	4680
60	agtacaacta	taactcacac	aatgtataca	tcacggcaga	caaacaaaag	aatggaatca	4740
	aagctaactt	caaaattcgc	cacaacattt	aagatggatc	cgttcaacta	gcagaccatt	4800
65	atcaacaaaa	tactccaattt	ggcgatggcc	ctgtcccttt	accagacaac	cattacctgt	4860
	cgacacaatc	tgccctttcg	aaagatccca	acgaaaagcg	tgaccacatg	gtccttcttg	4920
	agtttgcgtac	tgctgctggg	attacacatg	gcatggatga	gctctacaaa	taactgcagg	4980
	catgcaagct	tggcgtaatc	atggtcatacg	ctgtttcctg	tgtgaaattt	ttatccgctc	5040
	acaattccac	acaacatacg	agccggaagc	ataaaagtgt	aagcctgggg	tgcctaatga	5100

	gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg	5160
	tcgtgccagc tgcattaatg aatcgccaa cgcgaaattcc cgacagtaag acgggtaagc	5220
5	ctgttgcgtga taccgctgcc ttactgggtg cattagccag tctgaatgac ctgtcacggg	5280
	ataatccgaa gtggtcagac tgaaaatca gagggcagga actgctgaac agcaaaaagt	5340
10	cagatagcac cacatagcag acccgccata aaacgcccgt agaagcccgt gacgggcttt	5400
	tcttgtatta tgggtagttt ctttgcattga atccataaaa ggccgcgtta gtgcattta	5460
	cccccattca ctgccagagc cgtgagcgca gcgaactgaa tgtcacgaaa aagacagcga	5520
15	ctcagggtgcc tcatggtcgg agacaaaagg aatattcagc gatttgcgg agcttgcgag	5580
	ggtgctactt aagccttttag gtttaagg tctgtttgt agaggagcaa acagcgttg	5640
20	cgacatcctt ttgttaatact gcggaactga ctaaagttagt gagttataca caggctggg	5700
	atctattctt tttatctttt tttattc	5727
	<210> 7	
25	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador directo para metA11	
	<400> 7	
	gagtgcata tcatgccat tcgtgtgccg gac	33
35	<210> 8	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador directo para metA11	
	<400> 8	
	gcactcaagc tttaatcca gcgtggata catg	34
45	<210> 9	
	<211> 5545	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> pCL_Pcysk-gfp	
	<400> 9	
55	acactacacg atgcttaac tgcaaaaatt cagctcacca gtttgaggc aaaatttttg	60
	agtgacatgc aaagtaagta tgatctcaat gttcgttct catggctcac gcaaaaacaa	120
60		

	cgaaccacac tagagaacat actggctaaa tacggaagga totgaggttc ttatggctct	180
	tgtatctatc agtgaagcat caagactaac aaacaaaagt agaacaactg ttcaccgtta	240
5	catatcaaag ggaaaactgt ccatatgcac agatgaaaac ggtgtaaaaa agatagatac	300
	atcagagctt ttacgagttt ttgggtcatt caaagctgtt caccatgaac agatcgacaa	360
10	tgtaacagat gaacagcatg taacacctaa tagaacaggt gaaaccagta aaacaaagca	420
	actagaacat gaaattgaac acctgagaca acttgttaca gctcaacagt cacacataga	480
	cagcctgaaa caggcgatgc tgcttatcga atcaaagctg ccgacaacac gggagccagt	540
15	gacgcctccc gtggggaaaa aatcatggca attctggaag aaatagcgct ttcagccggc	600
	aaaccggctg aagccggatc tgcgattctg ataacaaact agcaacacca gaacagcccg	660
20	tttgcggca gcaaaaacccg tggaaattaa ttcccctgtc cgccgcaggct ggggtccaaag	720
	ctctcgggta acatcaaggc ccgatccttgc gagcccttgc cctccgcac gatgatcgtg	780
	ccgtgatcga aatccagatc cttgaccgcg agttgcaaacc cctcactgtat ccgcattgc	840
25	gttccataca gaagctggc gaacaaacga tgctcgccctt ccagaaaacc gaggatgcga	900
	accacttcat ccggggtcag caccacccgc aagcgccgcg acggccgagg tcttcgatc	960
30	tcctgaagcc agggcagatc cgtgcacagc accttgcgtt agaagaacag caaggccgccc	1020
	aatgcctgac gatgcgtgga gaccgaaacc ttgcgcgtcg tcgcgcgcgaa ggacagaaat	1080
35	gcctcgactt cgctgctgcc caaggttgcc ggggtgacgc caccgtggaa acggatgaag	1140
	gcacgaaccc agtggacata agcctgttcg gttcgtaagc tctaattgcaaa gtacgtatgc	1200
	cgctcactgcgca actgggtccag aaccttgacc gaacgcagcg gtggtaacgg cgcaatggcg	1260
40	gttttcatgg cttgttatga ctgtttttt ggggtacagt ctatgcctcg ggcattccaag	1320
	cagcaagcgc gttaccccgtt gggtcgtatgt ttgatgttat ggagcagcaa cgatgttacg	1380
45	cagcaggcga gtcgcctaa aacaaagtta aacatcatga gggaaagcggt gatgcggcga	1440
	gtatcgactc aactatcaga ggtatgtggc gtcatcgagc gccatctcgaccgcgttgc	1500
	ctggccgtac atttgcgtgg ctccgcgttg gatggccggcc tgaagccaca cagtatatt	1560
50	gatttgcgtgg ttacgggtgac cgttaaggctt gatgaaacaa cgcggcgagc tttgatcaac	1620
	gacctttgg aaacttcggc ttcccctggaa gagagcgaga ttctccgcgc tggatgttgc	1680
55	accattgttgc gtcacgcacga catcattcccg tggcggtatc cagctaaagcg cgaactgc	1740
	tttggagaat ggcagcgca tgacattctt gcaggtatct tcgagccagc cacgatcgac	1800
60	attgatctgg ctatcttgc gacaaaagca agagaacata gctttgcctt ggttaggtcca	1860
	gcggccggagg aactcttgc tccgggttgc gacaggatc tatttgaggc gctaaatgaa	1920
	accttaacgc tatggaactc gcccggcgc tggcggttgcg atgagcgaaa tggatgttgc	1980
65	acgttgcgttttccgcattttggta cagcgacgtt accggcaaaa tggatgttgcgtt ggtatgttgc	2040

	gccgactggg caatggagcg cctgccggcc cagtatcagc ccgtcatact tgaagctaga	2100
	caggcttatac ttggacaaga agaagatcgc ttggcctcgc ggcgcagatca gttggaaagaa	2160
5	tttgtccact acgtgaaagg cgagatcacc aaggttagtcg gcaaataatg tctaacaatt	2220
	cgttcaagcc gacggccgtt cgccggcggc ctttaactcaa ggcgttagatg cactaagcac	2280
10	ataattgctc acagccaaac tatcaggtca agtctgctt tattatttt aagcgtgcat	2340
	aataagccct acacaaattg ggagatatac catgaaaggc tggcttttc ttgttatcgc	2400
	aataagttggc gaagtaatcg caacatccgc attaaaatct agcgagggct ttactaagct	2460
15	cgtcagcggg tggtggcggg tgcggggct ggcttaacta tgccgcatac gagcagattg	2520
	tactgagagt gcaccatatg cgggtgtaaa taccgcacag atgcgttaagg agaaaatacc	2580
20	gcattcaggcg ccattcgcca ttcaaggctgc gcaactgttgc ggaaggcga tcggcgggg	2640
	cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag gggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg	2700
	taacgccagg gtttccagg tcacgacgtt gtaaaacgcac ggccagtgaa ttgcagctcg	2760
25	gtacccccagc ctgtttacga tgatcccgct gcttaatctg ttcatcatgc ccgttgcgg	2820
	ttgtggcgcg acggcgatgt ggtcgattt ctatcgcat aaacacgcga tgcggcgtt	2880
30	acaatctacc ggttattttt taaaccgttt gtgtgaaaca ggggtggctt atgcgcggcc	2940
	ttattccatc ttgcattgtca ttatccct tctgtatata gatatgctaa atcctactt	3000
	ccgcataattc tctgagcggg tatgctaccc gttgtatccc aatttcatac agttaaggag	3060
35	atatcatgag taaaggagaa gaactttca ctggagttgt cccaattctt gttgaattag	3120
	atggtgatgt taatggcac aaattttctg tcagtgagaa gggtaaggt gatgcaacat	3180
40	acggaaaact taccctaaa ttatccgtca ctactggaaa actacctgtt ccatggccaa	3240
	cacttgcac tactttctct tatgggtttc aatgctttc ccgttatccg gatcatatga	3300
	aacggcatga cttttcaag agtgcattgc ccgaaggta tgtacaggaa cgcactatac	3360
45	cttcaaaaga tgacggaaac tacaagacgc gtgctgaagt caagttgaa ggtgataccc	3420
	ttgttaatcg tatcgagttt aaaggtattt atttaaaga agatggaaac attctcgac	3480
50	acaaaactcga gtacaactat aactcacaca atgtatacat cacggcagac aaacaaaaga	3540
	atggaatcaa agctaacttc aaaattcgcc acaacattga agatggatcc gttcaactag	3600
55	cagaccatta tcaacaaaat actccaattt ggcgtggccc tgccttttccagacaacc	3660
	attacctgtc gacacaatct gcccttcga aagatccaa cggaaagcgt gaccacatgg	3720
	tccttcttga gtttgtaact gctgctggaa ttacacatgg catggatgag ctctacaaat	3780
60	aactgcaggc atgcaagctt ggcgtaatca tggcatacg tgcgttgcgt gtgaaattgt	3840
	tatccgctca caattccaca caacatacga gcccggaaagca taaagtgtaa agcctggggt	3900

	gcctaatgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg	3960
	ggaaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgaattccc gacagtaaga	4020
5	cgggtaagcc tggtgatgat accgctgcct tactgggtgc attagccagt ctgaatgacc	4080
	tgtcacggga taatccgaag tggtcagact ggaaaatcag agggcaggaa ctgctgaaca	4140
10	gcaaaaagtc agatagcacc acatagcaga cccgccataa aacgccctga gaagcccg	4200
	acgggctttt cttgtattat ggtagtttc cttgcataa tccataaaag gcgcctgt	4260
	tgccatttac ccccattcac tgccagagcc gtgagcgcag cgaactgaat gtcacgaaaa	4320
15	agacagcgac tcaggtgcct gatggtcgga gacaaaagga atattcagcg atttgcgg	4380
	gcttgcagg gtgctactta agcctttagg gtttaaggt ctgtttgtt gaggagcaaa	4440
20	cagcgttgc gacatcctt ttaataactg cggaactgac taaagtagtg agttatacac	4500
	agggctggga tctattcttt ttatctttt ttattcttc tttattctat aaattataac	4560
	cacttgaata taaacaaaaa aaacacacaa aggtctagcg gaatttacag agggcttagc	4620
25	agaatttaca agttttccag caaaggctta gcagaattt cagataccca caactcaaag	4680
	gaaaaggact agtaatttac attgacttagc ccatctcaat tggtatacg attaaaatca	4740
30	cctagaccaa ttgagatgta tgtctgaatt agttgtttc aaagcaaatg aactagcgat	4800
	tagtcgtat gacttaacgg agcatgaaac caagctaatt ttatgctgt tgccactact	4860
35	caacccccacg attgaaaacc ctacaaggaa agaacggacg gtatcggtca cttataacca	4920
	atacgctcag atgatgaaca tcagtagggaa aatgctttagt ggttattag ctaaagcaac	4980
	cagagagctg atgacgagaa ctgtggaaat caggaatcct ttggtaaag gctttgagat	5040
40	tttccagtcgg acaaactatg ccaagttctc aagcgaaaaa tttagaattag ttttagtga	5100
	agagatattg ctttatcttt tccagttaaa aaaattcata aaatataatc tggacatgt	5160
45	taagtctttt gaaaacaaat actctatgag gatttatgag tggttattaa aagaactaac	5220
	acaaaagaaa actcacaagg caaatataga gattgcctt gatgaattt agttcatgtt	5280
	aatgcttggaa aataactacc atgagttaa aaggcttaac caatgggttt tgaaaccaat	5340
50	aagtaaaagat ttaaacactt acagcaatat gaaattggtg gttgataagc gaggccgccc	5400
	gactgatacg ttgattttcc aagttgaact agatagacaa atggatctcg taaccgaact	5460
55	tgagaacaac cagataaaaa tgaatggtga caaaatacca acaaccattt catcagattc	5520
	ctacctacat aacggactaa gaaaa	5545
	<210> 10	
60	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador directo para sucAB	

	<400> 10 ggccaagctt gcatcaggcg taacaaagaa	30
5	<210> 11 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Cebador directo para sucAB	
	<400> 11 ggccaagctt tgtccatcct tcaatcg	30
15	<210> 12 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Cebador directo del casete de delección metB	
	<400> 12 ttactctggt gcctgacatt tcaccgacaa agcccaggga acttcatcac gtgtaggctg	60
25	gagctgcttc	70
	<210> 13 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Cebador inverso del casete de delección metB	
	<400> 13 cgctgcgcca gctccatacg cggcaccaggc gttcgcaacc cacgtagcag catatgaata	60
35	tcctccttag	70
40	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> Cebador directo para metB eliminado	
50	<400> 14 tattcgccgc tccattcagc	20
	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> Cebador directo para metB eliminado	
60	<400> 15 tacccttgt ttgcagcccg	20
	<210> 16 <211> 70 <212> ADN	
65		

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador directo para el casete de delección thrB	
	<400> 16	
	catggtaaaa gtttatgcc cggcttccag tgccaatatg agcgctgggt gtgtaggctg	60
10	gagctgcttc	70
	<210> 17	
	<211> 70	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para el casete de delección thrB	
20	<400> 17	
	ggagataccg ctcgctaccg cggcgatttc cgcgaccgccc tgccgcgcct catatgaata	60
	tcctccttag	70
25	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador directo para thrB eliminado	
	<400> 18	
	actcgacgat ctcttgcc	19
35	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador directo para thrB eliminado	
	<400> 19	
	acgcccagag gatctcgca g	21
45	<210> 20	
	<211> 30	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para metA11	
55	<400> 20	
	ggccgaattc atgccgattc gtgtgccgga	30
	<210> 21	
	<211> 30	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para metA11	
65	<400> 21	

ggccgagttc ttaatccagc gttggattca 30
 <210> 22
 <211> 933
 5 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <220>
 10 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(933)
 <223> SucA
 <400> 22
 15 Met Gln Asn Ser Ala Leu Lys Ala Trp Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Asn Gln Ser Trp Ile Glu Gln Leu Tyr Glu Asp Phe Leu Thr
 20 25 30
 20 Asp Pro Asp Ser Val Asp Ala Asn Trp Arg Ser Thr Phe Gln Gln Leu
 35 40 45
 25 Pro Gly Thr Gly Val Lys Pro Asp Gln Phe His Ser Gln Thr Arg Glu
 50 55 60
 Tyr Phe Arg Arg Leu Ala Lys Asp Ala Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ile
 65 70 75 80
 30 Ser Asp Pro Asp Thr Asn Val Lys Gln Val Lys Val Leu Gln Leu Ile
 85 90 95
 Asn Ala Tyr Arg Phe Arg Gly His Gln His Ala Asn Leu Asp Pro Leu
 35

40

45

50

55

60

65

	100	105	110
	Gly Leu Trp Gln Gln Asp Lys Val Ala Asp Leu Asp Pro Ser Phe His		
	115	120	125
5	Asp Leu Thr Glu Ala Asp Phe Gln Glu Thr Phe Asn Val Gly Ser Phe		
	130	135	140
10	Ala Ser Gly Lys Glu Thr Met Lys Leu Gly Glu Leu Leu Glu Ala Leu		
	145	150	155
	Lys Gln Thr Tyr Cys Gly Pro Ile Gly Ala Glu Tyr Met His Ile Thr		
	165	170	175
15	Ser Thr Glu Glu Lys Arg Trp Ile Gln Gln Arg Ile Glu Ser Gly Arg		
	180	185	190
20	Ala Thr Phe Asn Ser Glu Glu Lys Lys Arg Phe Leu Ser Glu Leu Thr		
	195	200	205
	Ala Ala Glu Gly Leu Glu Arg Tyr Leu Gly Ala Lys Phe Pro Gly Ala		
	210	215	220
25	Lys Arg Phe Ser Leu Glu Gly Asp Ala Leu Ile Pro Met Leu Lys		
	225	230	235
	Glu Met Ile Arg His Ala Gly Asn Ser Gly Thr Arg Glu Val Val Leu		
	245	250	255
30	Gly Met Ala His Arg Gly Arg Leu Asn Val Leu Val Asn Val Leu Gly		
	260	265	270
35	Lys Lys Pro Gln Asp Leu Phe Asp Glu Phe Ala Gly Lys His Lys Glu		
	275	280	285
	His Leu Gly Thr Gly Asp Val Lys Tyr His Met Gly Phe Ser Ser Asp		
	290	295	300
40	Phe Gln Thr Asp Gly Gly Leu Val His Leu Ala Leu Ala Phe Asn Pro		
	305	310	315
	Ser His Leu Glu Ile Val Ser Pro Val Val Ile Gly Ser Val Arg Ala		
45	325	330	335
	Arg Leu Asp Arg Leu Asp Glu Pro Ser Ser Asn Lys Val Leu Pro Ile		
	340	345	350
50	Thr Ile His Gly Asp Ala Ala Val Thr Gly Gln Gly Val Val Gln Glu		
	355	360	365
	Thr Leu Asn Met Ser Lys Ala Arg Gly Tyr Glu Val Gly Gly Thr Val		
	370	375	380
55	Arg Ile Val Ile Asn Asn Gln Val Gly Phe Thr Thr Ser Asn Pro Leu		
	385	390	395
	Asp Ala Arg Ser Thr Pro Tyr Cys Thr Asp Ile Gly Lys Met Val Gln		
60	405	410	415
	Ala Pro Ile Phe His Val Asn Ala Asp Asp Pro Glu Ala Val Ala Phe		
	420	425	430
65	Val Thr Arg Leu Ala Leu Asp Phe Arg Asn Thr Phe Lys Arg Asp Val		

	435	440	445
	Phe Ile Asp Leu Val Cys Tyr Arg Arg His Gly His Asn Glu Ala Asp		
5	450	455	460
	Glu Pro Ser Ala Thr Gln Pro Leu Met Tyr Gln Lys Ile Lys Lys His		
	465	470	475
10	Pro Thr Pro Arg Lys Ile Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Gln Glu Lys Val		
	485	490	495
	Ala Thr Leu Glu Asp Ala Thr Glu Met Val Asn Leu Tyr Arg Asp Ala		
	500	505	510
15	Leu Asp Ala Gly Asp Cys Val Val Ala Glu Trp Arg Pro Met Asn Met		
	515	520	525
20	His Ser Phe Thr Trp Ser Pro Tyr Leu Asn His Glu Trp Asp Glu Glu		
	530	535	540
	Tyr Pro Asn Lys Val Glu Met Lys Arg Leu Gln Glu Leu Ala Lys Arg		
	545	550	555
25	Ile Ser Thr Val Pro Glu Ala Val Glu Met Gln Ser Arg Val Ala Lys		
	565	570	575
	Ile Tyr Gly Asp Arg Gln Ala Met Ala Ala Gly Glu Lys Leu Phe Asp		
30	580	585	590
	Trp Gly Gly Ala Glu Asn Leu Ala Tyr Ala Thr Leu Val Asp Glu Gly		
	595	600	605
35	Ile Pro Val Arg Leu Ser Gly Glu Asp Ser Gly Arg Gly Thr Phe Phe		
	610	615	620
	His Arg His Ala Val Ile His Asn Gln Ser Asn Gly Ser Thr Tyr Thr		
	625	630	635
40	640	645	650
	Pro Leu Gln His Ile His Asn Gly Gln Gly Ala Phe Arg Val Trp Asp		
	655		
	Ser Val Leu Ser Glu Glu Ala Val Leu Ala Phe Glu Tyr Gly Tyr Ala		
45	660	665	670
	Thr Ala Glu Pro Arg Thr Leu Thr Ile Trp Glu Ala Gln Phe Gly Asp		
	675	680	685
50	Phe Ala Asn Gly Ala Gln Val Val Ile Asp Gln Phe Ile Ser Ser Gly		
	690	695	700
	Glu Gln Lys Trp Gly Arg Met Cys Gly Leu Val Met Leu Leu Pro His		
55	705	710	715
	Gly Tyr Glu Gly Gln Gly Pro Glu His Ser Ser Ala Arg Leu Glu Arg		
	725	730	735
60	Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Glu Gln Asn Met Gln Val Cys Val Pro Ser		
	740	745	750
	Thr Pro Ala Gln Val Tyr His Met Leu Arg Arg Gln Ala Leu Arg Gly		
	755	760	765
65	Met Arg Arg Pro Leu Val Val Met Ser Pro Lys Ser Leu Leu Arg His		

	770	775	780	
	Pro Leu Ala Val Ser Ser Leu Glu Glu Leu Ala Asn Gly Thr Phe Leu			
5	785 790 795 800			
	Pro Ala Ile Gly Glu Ile Asp Glu Leu Asp Pro Lys Gly Val Lys Arg			
	805 810 815			
10	Val Val Met Cys Ser Gly Lys Val Tyr Tyr Asp Leu Leu Glu Gln Arg			
	820 825 830			
	Arg Lys Asn Asn Gln His Asp Val Ala Ile Val Arg Ile Glu Gln Leu			
	835 840 845			
15	Tyr Pro Phe Pro His Lys Ala Met Gln Glu Val Leu Gln Gln Phe Ala			
	850 855 860			
20	His Val Lys Asp Phe Val Trp Cys Gln Glu Glu Pro Leu Asn Gln Gly			
	865 870 875 880			
	Ala Trp Tyr Cys Ser Gln His His Phe Arg Glu Val Ile Pro Phe Gly			
	885 890 895			
25	Ala Ser Leu Arg Tyr Ala Gly Arg Pro Ala Ser Ala Ser Pro Ala Val			
	900 905 910			
	Gly Tyr Met Ser Val His Gln Lys Gln Gln Gln Asp Leu Val Asn Asp			
30	915 920 925			
	Ala Leu Asn Val Glu			
	930			
35	<210> 23			
	<211> 2802			
	<212> ADN			
	<213> Escherichia coli			
40	<220>			
	<221> Gen			
	<222> (1) .. (2802)			
	<223> sucA			
45	<400> 23			
	atgcagaaca ggcgttgaa agcctggttg gactttctt acctctctgg cgcaaaccag			60
	agctggatag aacagctcta tgaagacttc ttaaccgatc ctgactcggt tgacgctaac			120
50	tggcgttcga cgttccagca gttacctggc acgggagtca aaccggatca attccactct			180
	caaacgcgtg aatattccg ccgcctggcg aaagacgctt cacgttactc ttcaacgatc			240
	tccgaccctg acaccaatgt gaagcagggtt aaagtccctgc agtcattaa cgcataccgc			300
55	ttccgtggtc accagcatgc gaatctcgat ccgctgggac tgtggcagca agataaagtgc			360
	gccgatctgg atccgtcttt ccacgatctg accgaagcag acttccagga gaccttcaac			420
60	gtcggttcat ttgccagcgg caaagaaacc atgaaactcg gcgagctgct ggaagccctc			480
	aagcaaacct actgcggccc gattggtgcc gagtatatgc acattaccag caccgaagaa			540

	aaacgctgga tccaacacgctatcgagtct ggtcgccgca ctttcaatag cgaagagaaa	600
	aaacgcttct taagcgaact gaccgcccgt gaaggcttgc aacgttaccc cggcgcacaaa	660
5	ttccctggcg caaaacgctt ctcgctggaa ggcgggtgacg cgttaatccc gatgcttaaa	720
	gagatgatcc gccacgctgg caacagcggc acccgccaaag tggttctcg gatggcgcac	780
10	cgtggtcgtc tgaacgtgct ggtgaacgtg ctgggtaaaa aaccgcaaga cttgttcgac	840
	gagttcgccg gttaaacataa agaacacactc ggcacgggtg acgtgaaata ccacatgggc	900
	ttctcgatcg acttccagac cgatggccggc ctgggtgcacc tggcgctggc gtttaacccg	960
15	tctcaccttg agattgtaa cccggtagtt atcggttctg ttctgtccccg tctggacaga	1020
	cttgatgagc cgagcagcaa caaagtgctg ccaatcacca tccacggta cgccgcagtg	1080
20	accgggcagg gcgtggttca gaaaaaccctg aacatgtcga aagcgcgtgg ttatgaagtt	1140
	ggcggtaggg tacgtatcg tataacaac caggttggtt tcaccacctc taatccgctg	1200
25	gatgcccgtt ctacgcccgt a cgtactgtatcgtaaga tggttcaggc cccgattttc	1260
	cacgttaacg cggacgatcc ggaagccgtt gcctttgtga cccgtctggc gctcgatttc	1320
	cgtaaacacctt taaaacgtga tgtcttcatc gacctgggtgt gataccgccc tcacggccac	1380
30	aacgaagccg acgagccgag cgcaacccag ccgctgatgt atcagaaaat caaaaaacat	1440
	ccgacaccgc gcaaaatcta cgctgacaag ctggagcagg aaaaagtggc gacgcgtggaa	1500
35	gatgccaccg agatggtaa cctgtaccgc gatgcgttgcg atgctggcga ttgcgttagtg	1560
	gcagagtgcc gtcgcgtgaa catgcactct ttcacctggt cgccgtaccc caaccacgaa	1620
	tgggacgaa agtacccgaa caaagttgag atgaagcgcc tgcaggagct ggcgaaacgc	1680
40	atcagcacgg tgccgaaagc agttgaaatg cagtctcgatcg ttgccaagat ttatggcgat	1740
	cgccaggcga tggctgccgg tgagaaactg ttcgactggg ggggtgcggaa aaacctcgat	1800
45	tacccacgc tgggtgatga aggcatccg gttcgccgtcg cgggtgaaga ctccggcgc	1860
	ggtagcttct tccaccgcca cgcgggtatc cacaaccagt ctaacggttc cacttacacg	1920
	ccgctgcaac atatccataa cgggcaggcc gcttccgtg tctgggactc cgtactgtct	1980
50	gaagaagcag tgctggcgatcg tgaatatggt tatgccaccg cagaaccacg cactctgacc	2040
	atctgggaag cgcagttcgatcg tgacttcgatcg aacgggtgcgc aggtggttat cgaccagttc	2100
55	atctcctctg gcaacacgaa atggggccgg atgtgtggtc tgggtgatgtt gctgcgcac	2160
	ggttacgaa ggcaggggcc ggagcactcc tccgcgcgtc tggaaacgtta tctgcaactt	2220
60	tgtgctgagc aaaacatgca ggttgcgtatcc cggcacaggt ttaccacatg	2280
	ctgcgtcgatcg aggccgtcgatcg cggatgcgt cgtccgttgc tctgtatgtc gccgaaatcc	2340
	ctgcgtcgatcg atccgcgttgc ggttccagc ctcgaagaac tggcgaacgg caccttcctg	2400
65	ccagccatcg gtgaaatcgat cgagcttgcgtatcg ccgaaggccg tgaagcgcgt agtgcgtgt	2460

	tctggtaagg tttattacga cctgctggaa cagcgtcgta agaacaatca acacgatgtc	2520
	gccattgtgc gtatcgagca actctacccg ttcccgata aagcgatgca ggaagtgttgc	2580
5	cagcagtttgc ctcacgtcaa ggattttgtc tggtgccagg aagagccgct caaccaggc	2640
	gcatggtaact gcagccagca tcattccgt gaagtgattc cggtggggc ttctctgcgt	2700
10	tatgcaggcc gcccggcctc cgcctctccg gcggtagggt atatgtccgt tcaccagaaa	2760
	cagcaacaag atctggtaa tgacgcgctg aacgtcgaat aa	2802
	<210> 24	
	<211> 405	
15	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
	<220>	
20	<221> PÉPTIDO	
	<222> (1)..(405)	
	<223> SucB	
	<400> 24	
25	Met Ser Ser Val Asp Ile Leu Val Pro Asp Leu Pro Glu Ser Val Ala	
	1 5 10 15	
	Asp Ala Thr Val Ala Thr Trp His Lys Lys Pro Gly Asp Ala Val Val	
	20 25 30	
30	Arg Asp Glu Val Leu Val Glu Ile Glu Thr Asp Lys Val Val Leu Glu	
	35 40 45	
35	Val Pro Ala Ser Ala Asp Gly Ile Leu Asp Ala Val Leu Glu Asp Glu	
	50 55 60	
	Gly Thr Thr Val Thr Ser Arg Gln Ile Leu Gly Arg Leu Arg Glu Gly	
	65 70 75 80	
40	Asn Ser Ala Gly Lys Glu Thr Ser Ala Lys Ser Glu Glu Lys Ala Ser	
	85 90 95	
45	Thr Pro Ala Gln Arg Gln Gln Ala Ser Leu Glu Glu Gln Asn Asn Asp	
	100 105 110	
	Ala Leu Ser Pro Ala Ile Arg Arg Leu Leu Ala Glu His Asn Leu Asp	
	115 120 125	
50	Ala Ser Ala Ile Lys Gly Thr Gly Val Gly Gly Arg Leu Thr Arg Glu	
	130 135 140	
55	Asp Val Glu Lys His Leu Ala Lys Ala Pro Ala Lys Glu Ser Ala Pro	
	145 150 155 160	
	Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gln Pro Ala Leu Ala Ala Arg Ser Glu	
	165 170 175	
60	Lys Arg Val Pro Met Thr Arg Leu Arg Lys Arg Val Ala Glu Arg Leu	
	180 185 190	
	Leu Glu Ala Lys Asn Ser Thr Ala Met Leu Thr Thr Phe Asn Glu Val	
65		

	195	200	205	
	Asn Met Lys Pro Ile Met Asp Leu Arg Lys Gln Tyr Gly Glu Ala Phe			
5	210	215	220	
	Glu Lys Arg His Gly Ile Arg Leu Gly Phe Met Ser Phe Tyr Val Lys			
	225	230	235	240
10	Ala Val Val Glu Ala Leu Lys Arg Tyr Pro Glu Val Asn Ala Ser Ile			
	245	250	255	
	Asp Gly Asp Asp Val Val Tyr His Asn Tyr Phe Asp Val Ser Met Ala			
15	260	265	270	
	Val Ser Thr Pro Arg Gly Leu Val Thr Pro Val Leu Arg Asp Val Asp			
	275	280	285	
20	Thr Leu Gly Met Ala Asp Ile Glu Lys Lys Ile Lys Glu Leu Ala Val			
	290	295	300	
	Lys Gly Arg Asp Gly Lys Leu Thr Val Glu Asp Leu Thr Gly Gly Asn			
25	305	310	315	320
	Phe Thr Ile Thr Asn Gly Gly Val Phe Gly Ser Leu Met Ser Thr Pro			
	325	330	335	
30	Ile Ile Asn Pro Pro Gln Ser Ala Ile Leu Gly Met His Ala Ile Lys			
	340	345	350	
	Asp Arg Pro Met Ala Val Asn Gly Gln Val Glu Ile Leu Pro Met Met			
35	355	360	365	
	Tyr Leu Ala Leu Ser Tyr Asp His Arg Leu Ile Asp Gly Arg Glu Ser			
	370	375	380	
40	Val Gly Phe Leu Val Thr Ile Lys Glu Leu Leu Glu Asp Pro Thr Arg			
	385	390	395	400
	Leu Leu Leu Asp Val			
	405			
45	<210> 25			
	<211> 1218			
	<212> ADN			
	<213> Escherichia coli			
50	<220>			
	<221> Gen			
	<222> (1) .. (1218)			
	<223> sucB			
55	<400> 25			
	atgagtagcg tagatattct ggtccctgac ctgcctgaat ccgtagccga tgccaccgtc		60	
	gcaacctggc ataaaaaaacc cggcgacgca gtcgtacgtg atgaagtgtc ggtagaaatc		120	
60	gaaactgaca aagtggtaact ggaagtaccg gcatcagcag acggcattct ggatgcgtt		180	
	ctggaagatg aaggtacaac ggtaacgtct cgtcagatcc ttggtcgcct gcgtgaaggc		240	
	aacagcgccg gtaaagaaac cagcgccaaa tctgaagaga aagcgtccac tccggcgcaa		300	
65				

	cgccagcagg cgtctctgga agagcaaaac aacgatgcgt taagccggc gatccgtcgc	360
	ctgctggctg aacacaatct cgacgccagc gccattaaag gcaccggtgt gggtggtcgt	420
5	ctgactcgtg aagatgtgga aaaacatctg gcgaaagccc cggcgaaaga gtctgctccg	480
	gcagcggctg ctccggccgc gcaaccggct ctggctgcac gtatgtaaaa acgtgtcccg	540
10	atgactcgcc tgcgttaagcg tgtggcagag cgtctgctgg aagcgaaaaa ctccaccgccc	600
	atgctgacca cgttcaacga agtcaacatg aagccgatta tggatctgcg taagcagtac	660
	ggtgaagcgt ttgaaaaacg ccacggcatc cgtctgggct ttatgtcctt ctacgtaaaa	720
15	gcggtggttg aagccctgaa acgttacccg gaagtgaacg cttctatcga cggcgatgac	780
	gtggtttacc acaactattt cgacgtcagc atggcggtt ctacgcccgc cggcctggtg	840
20	acgcccgttc tgcgtgatgt cgataccctc ggcattggcag acatcgagaa gaaaatcaaa	900
	gagctggcag tcaaaggccg tgacggcaag ctgaccgttg aagatctgac cggtgtaac	960
	ttcaccatca ccaacggtgg tgtgttcggt tccctgatgt ctacgcccgt catcaacccg	1020
25	ccgcagagcg caattctggg tatgcacgct atcaaagatc gtccgatggc ggtgaatgg	1080
	caggttgaga tcctgccgt gatgtacctg gcgctgtcct acgatcaccg tctgatcgat	1140
30	ggtcgcgaat ccgtgggctt cctggtaacg atcaaagagt tgctggaaga tccgacgcgt	1200
	ctgctgctgg acgtgttag	1218
35	<210> 26 <211> 309 <212> PRT <213> Escherichia coli	
40	<220> <221> PÉPTIDO <222> (1) .. (309) <223> MetA	
45	<400> 26 Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg 1 5 10 15	
50	Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu 20 25 30	
	Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile 35 40 45	
55	Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln 50 55 60	
60	Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr 65 70 75 80	
	Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln 85 90 95	

	Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu			
	100	105	110	
5	Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu			
	115	120	125	
	Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala			
10	130	135	140	
	Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg			
	145	150	155	160
15	Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His			
	165	170	175	
	Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser			
	180	185	190	
20	Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu			
	195	200	205	
25	Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser			
	210	215	220	
	Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala			
	225	230	235	240
30	Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp			
	245	250	255	
35	Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr			
	260	265	270	
	Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp			
	275	280	285	
40	Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met			
	290	295	300	
	Asn Pro Thr Leu Asp			
45	305			
	<210> 27			
	<211> 930			
	<212> ADN			
50	<213> Escherichia coli			
	<220>			
	<221> Gen			
	<222> (1) .. (930)			
55	<223> metA			
	<400> 27			
	atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgtga agaaaaacgtc		60	
60	tttgtatga caacttctcg tgcgtctggc cagggaaattc gtccacttaa ggttctgatc		120	
	cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgcct gctttcaaac		180	
65	tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttgc cgcatcgatt cccgtgaatc gcgcaacacg		240	

cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgttaactgg tgccgcgtg ggcctggtgg agtttaatga tgtcgcttac 360
 5 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420
 gtctgctggg cggtacaggc cgcgcataat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 10 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gttctgacg 540
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccc cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggagaagg ggatgcata 660
 15 ctgtttgcga gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccgat atatgtgcg 720
 caaacgcgtgg cgcaggaatt tttccgcgt gtggaaagccg gactagaccc ggatgtaccg 780
 20 tataactatt tcccgacaa tgatccgaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttacca ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat 900
 ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa 930
 25 <210> 28
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 30 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1) .. (386)
 <223> MetB
 35 <400> 28
 Met Thr Arg Lys Gln Ala Thr Ile Ala Val Arg Ser Gly Leu Asn Asp
 1 5 10 15
 40 Asp Glu Gln Tyr Gly Cys Val Val Pro Pro Ile His Leu Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Asn Phe Thr Gly Phe Asn Glu Pro Arg Ala His Asp Tyr Ser Arg
 45 35 40 45
 Arg Gly Asn Pro Thr Arg Asp Val Val Gln Arg Ala Leu Ala Glu Leu
 50 55 60
 50 Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile
 65 70 75 80
 His Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala
 55 85 90 95
 Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala
 100 105 110
 60 Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln
 115 120 125
 Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu
 65

	130	135	140	
	Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys			
5	145	150	155	160
	His Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe			
	165	170	175	
10	Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val			
	180	185	190	
	Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala			
15	195	200	205	
	Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Asp Val Val Thr Glu Leu Ala Trp			
	210	215	220	
20	Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu			
	225	230	235	240
	Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln			
25	245	250	255	
	Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val			
	260	265	270	
30	Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile			
	275	280	285	
	Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu			
	290	295	300	
35	Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu			
	305	310	315	320
40	Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His			
	325	330	335	
	Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala			
	340	345	350	
45	Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp			
	355	360	365	
50	Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn			
	370	375	380	
	Lys Gly			
	385			
55	<210> 29			
	<211> 1161			
	<212> ADN			
	<213> Escherichia coli			
60	<220>			
	<221> Gen			
	<222> (1) .. (1161)			
	<223> metB			
65				

<400> 29
 atgacgcgt aacaggccac catgcagt cgtacgggt taaatgacga cgaacagtat 60
 ggttgcgtt cccaccat ccatcttcc agcacctata actttaccgg atttaatgaa
 5 cccgcgcgc atgattactc gcgtcgccg aacccaacgc gcgatgtggt tcagcgtgcg
 ctggcagaac tggaaagggtgg tgctggtgca gtacttacta ataccggcat gtccgcgatt
 10 cacctggtaa cgaccgtctt tttgaaacct ggcgatctgc tggttgcgcc gcacgactgc
 tacggcggta gctatcgccct gttcgacagt ctggcgaaac gcggttgcta tcgcgtgttg
 15 tttgttgcgt aaggcgatga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg
 gtactggtag aaagcccaag taatccattt gtcgcgtcg tggatattgc gaaaatctgc
 catctggcaa gggaaagtgg ggcggtgagc gtgggtggata acaccttctt aagccggca
 20 ttacaaaatc cgctggcatt aggtgccat ctgggttgc attcatgcac gaaatatctg
 aacggtcact cagacgtagt ggcggcgtg gtgattgcta aagacccgga cgttgcact
 25 gaactggcct ggtgggcaaa caatattggc gtgacggcg ggcgcgttga cagctatctg
 ctgctacgtg ggttgcgaac gctggtgccg cgtatggagc tggcgagcgc caacgcgcag
 gcgattgtga aatacctgca aacccagccg ttggtaaaaa aactgtatca cccgtcggt
 30 ccggaaaaatc aggggcatga aattgcccg cgcagcaaa aaggcttgg cgcaatgttg
 agtttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcg ttctggcg gctgtcggt
 35 tttacgctgg cggaaatcatt agggggagtg gaaagttaa tctctcacgc cgcaaccatg
 acacatgcag gcatggcacc agaagcgcgt gctggcccg ggatctccga gacgctgctg
 40 cgtatctcca ccggatttga agatggcgaa gatttaatttgc cgcacctgga aaatggcttc
 cgggctgcaa acaagggtta a 1161

<210> 30
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1) .. (310)
 <223> ThrB

<400> 30
 Met Val Lys Val Tyr Ala Pro Ala Ser Ser Ala Asn Met Ser Val Gly
 5 1 5 10 15

Met Val Lys Val Tyr Ala Pro Ala Ser Ser Ala Asn Met Ser Val Gly
 20 25 30

Phe Asp Val Leu Gly Ala Ala Val Thr Pro Val Asp Gly Ala Leu Leu
 60 35 40 45

Gly Asp Val Val Thr Val Glu Ala Ala Glu Thr Phe Ser Leu Asn Asn
 40 45

Leu Gly Arg Phe Ala Asp Lys Leu Pro Ser Glu Pro Arg Glu Asn Ile

	50	55	60	
	Val Tyr Gln Cys Trp Glu Arg Phe Cys Gln Glu Leu Gly Lys Gln Ile			
5	65	70	75	80
	Pro Val Ala Met Thr Leu Glu Lys Asn Met Pro Ile Gly Ser Gly Leu			
	85	90	95	
10	Gly Ser Ser Ala Cys Ser Val Val Ala Ala Leu Met Ala Met Asn Glu			
	100	105	110	
	His Cys Gly Lys Pro Leu Asn Asp Thr Arg Leu Leu Ala Leu Met Gly			
15	115	120	125	
	Glu Leu Glu Gly Arg Ile Ser Gly Ser Ile His Tyr Asp Asn Val Ala			
	130	135	140	
20	Pro Cys Phe Leu Gly Gly Met Gln Leu Met Ile Glu Glu Asn Asp Ile			
	145	150	155	160
	Ile Ser Gln Gln Val Pro Gly Phe Asp Glu Trp Leu Trp Val Leu Ala			
25	165	170	175	
	Tyr Pro Gly Ile Lys Val Ser Thr Ala Glu Ala Arg Ala Ile Leu Pro			
	180	185	190	
30	Ala Gln Tyr Arg Arg Gln Asp Cys Ile Ala His Gly Arg His Leu Ala			
	195	200	205	
	Gly Phe Ile His Ala Cys Tyr Ser Arg Gln Pro Glu Leu Ala Ala Lys			
35	210	215	220	
	Leu Met Lys Asp Val Ile Ala Glu Pro Tyr Arg Glu Arg Leu Leu Pro			
	225	230	235	240
40	Gly Phe Arg Gln Ala Arg Gln Ala Val Ala Glu Ile Gly Ala Val Ala			
	245	250	255	
	Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Pro Thr Leu Phe Ala Leu Cys Asp Lys			
45	260	265	270	
	Pro Glu Thr Ala Gln Arg Val Ala Asp Trp Leu Gly Lys Asn Tyr Leu			
	275	280	285	
50	Gln Asn Gln Glu Gly Phe Val His Ile Cys Arg Leu Asp Thr Ala Gly			
	290	295	300	
	Ala Arg Val Leu Glu Asn			
55	305	310		
	<210> 31			
	<211> 933			
	<212> ADN			
	<213> Escherichia coli			
60	<220>			
	<221> Gen			
	<222> (1) .. (933)			
	<223> thrB			
65				

<400> 31

5	atggtaaag tttatcccc ggcttcagt gccaatatga ggtcggtt tgatgtgctc ggggcggcgg tgacacctgt tgatggtgca ttgctcgag atgtagtcac gggtgaggcg	60 120
10	gcagagacat tcagtctcaa caacctcgga cgcttgcgg ataagctgcc gtcagaacca cgggaaaata tcgttatca gtgctggag cggtttgcc aggaactggg taagcaaatt	180 240
15	ccagtggcga tgaccctgga aaagaatatg ccgatcggtt cgggcttagg ctccagtgcc tgttcggtgg tcgcggcgct gatggcgatg aatgaacact goggcaagcc gcttaatgac	300 360
20	actcgttgc tggcttgat gggcgagctg gaaggccgta tctccggcag cattcattac gacaacgtgg caccgtgtt tctcggtgg atgcagttga tgatcgaaga aaacgacatc	420 480
25	atcagccagc aagtccagg gtttgcgtt gggctgtgg tgctggcgta tccgggatt aaagtctcga cggcagaagc caggctatt ttaccggcgc agtatcgccg ccaggattgc	540 600
30	attgcgcacg ggccacatct ggccaggcttc attcagccct gctattcccg tcagcgtgag cttgcgcga agctgatgaa agatgttatac gctgaaccct accgtgaacg gttactgcc	660 720
35	ggcttccggc aggccggca ggcgtcgcg gaaatccggc cggttagcgag cggtatctcc ggctccggcc cgaccctgtt cgctctgtgt gacaagccgg aaaccgcccc ggcgttgcc	780 840
40	gactggttgg gtaagaacta cctgcaaaat caggaagggtt ttgttcatat ttgcggctg <210> 32 <211> 309 <212> PRT <213> Secuencia Artificial	900 933
45	Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg 1 5 10 15	
50	Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Pro Gly Gln Glu 20 25 30	
55	Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile 35 40 45	
60	Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln 50 55 60	
65	Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr 65 70 75 80	
70	Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln 85 90 95	
75	Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu 100 105 110	

	Val Gly Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu			
	115	120	125	
5	Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Ser Val Cys Trp Ala			
	130	135	140	
	Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg			
	145	150	155	160
10	Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His			
	165	170	175	
15	Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser			
	180	185	190	
	Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu			
	195	200	205	
20	Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser			
	210	215	220	
25	Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala			
	225	230	235	240
	Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp			
	245	250	255	
30	Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr			
	260	265	270	
35	Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp			
	275	280	285	
	Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met			
	290	295	300	
40	Asn Pro Thr Leu Asp			
	305			
	<210> 33			
45	<211> 930			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia Artificial			
	<220>			
50	<223> metA11			
	<400> 33			
	atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgtga agaaaacgtc		60	
55	tttgtatga caacttctcg tgccctggc cagaaattc gtccacttaa ggttctgatc		120	
	cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgcct gctttcaaac		180	
	tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttgc cgcatcgatt cccgtgaatc gcgcaacacg		240	
60	cccgccagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt		300	
	gacggtttga ttgttaactgg tgccgcgtg ggcctggtgg ggttaatga tgtcgcttac		360	

	tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtct	420
	gtctgctggg cgg tacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc	480
5	accaaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gttctgacg	540
	cgtggctttg atgattcatt cctggcaccc cattcgcgt atgctgactt tccggcagcg	600
10	ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcata	660
	ctgtttgcca gtaaagataa ggcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg	720
	caaacgctgg cgccaggatt tttccgcgt gtggaaagccg gactagaccc ggatgtaccg	780
15	tataactatt tcccgaccaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac	840
	ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat	900
20	ctacggcaca tgaatccaaac gctggattaa	930
	<210> 34	
	<211> 15351	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> vector pCC1BAC_srcO	
30	<400> 34 cctggactg ctacgatctg ataagccagc tgatcgaggg cgatacgccc gaaacgctac	60
	aacgctacct gcccgaacg ctgcagttc ggcatacgta ataactgagt atttttgaat	120
35	agcgacgctg gatgccgatt ggtctgaacg gcccggcgat cgccgggcat accattggcg	180
	ccggcatcgt gctggtaacg accatattag ggcgtttgag cagttgcctg gcctcacgca	240
40	gggagactgg attaactgac cgctgacaaa atgcctgaca atgacagtcc gttttgtgcc	300
	ggcatgcaag cttgagtatt ctatagtctc acctaaatag cttggcgtaa tcatggtcat	360
	agctgtttcc tggtaat ttttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa	420
45	gcataaaagtg taaagcctgg ggtgccta atgagcttgc gactcacatta attgcgttgc	480
	gctcaactgcc cgctttccag tcggaaacc tgcgtgcc gctgcattaa tgaatcgcc	540
50	aacgcgaacc cttgcggcc gcccggccg tcgaccaatt ctcatgtttg acagcttac	600
	atcgaatttc tgccattcat ccgttatttc tcacttattc aggcgttagca accaggcggt	660
	taagggcacc aataactgcc ttaaaaaat tacgccccgc cctgccactc atcgcagtac	720
55	tgtgttaatt cattaagcat tctgccgaca tggaaagccat cacaaacggc atgatgaacc	780
	tgaatcgcca gggcatcag caccttgcgt cttgcgtat aatatttgcc catggtaaa	840
60	acgggggcga agaagttgtc catattggcc acgtttaaat caaaactggt gaaactcacc	900
	cagggattgg ctgagacgaa aaacatattc tcaataaaacc cttagggaa ataggccagg	960

	ttttcaccgt aacacgcccac atcttgcgaa tatatgtgta gaaactgccc gaaatcgctcg	1020
	tggtattcac tccagagcga tgaaaacggtt tcagttgtt catggaaaac ggtgttaacaa	1080
5	gggtgaacac tatcccatat caccagctca ccgtctttca ttgccatacg aaattccgga	1140
	tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga ataaaaggccc gataaaaactt gtgcttattt	1200
10	ttctttacgg tctttaaaaa ggccgttaata tccagctgaa cggtotgggtt ataggtacat	1260
	tgagcaactg actgaaaatgc ctcaaaatgt tctttacgtat gccattggga tatatcaacg	1320
	gtggtatatc cagtgatttt tttctccatt ttagcttcct tagctcctga aaatctcgat	1380
15	aactcaaaaa atacgcccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt ggaacctt	1440
	acgtgccat caacgtctca tttcgccaa aagttggccc agggcttccc ggtatcaaca	1500
20	gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttcgg tcacaggtat ttattcgca	1560
	taagctcatg gagcggcgta accgtcgac aggaaggaca gagaaagcgc ggatctggga	1620
25	agtgacggac agaacggtca ggacctggat tggggaggcg gttgcggccg ctgctgtga	1680
	cggtgtgacg ttctctgttc cggtcacacc acatacgttc cgccattcct atgcgatgca	1740
	catgctgtat gccggtatac cgctgaaagt tctgcaaagc ctgatggac ataagtccat	1800
30	cagttcaacg gaagtctaca cgaagggttt tgcgctggat gtggctgccc ggcaccgggt	1860
	gcagtttgcg atgcccggagt ctgatgcggt tgcgatgctg aaacaattat cctgagaata	1920
35	aatgccttgg cctttatatg gaaatgtgga actgagtgga tatgtgttt ttgtctgtta	1980
	aacagagaag ctggctgtta tccactgaga agcgaacgaa acagtcggga aaatctccca	2040
	ttatcgtaga gatccgcatt attaatctca ggagcctgtg tagcgtttat aggaagtagt	2100
40	gttctgtcat gatgcctgca agcggtaacg aaaacgattt gaatatgcct tcaggaacaa	2160
	tagaaatctt cgtcggtgt tacgttgaag tggagcggat tatgtcagca atggacagaa	2220
45	caacctaattt aacacagaac catgatgtgg tctgtcctt tacagccagt agtgcgtgcc	2280
	gcagtcgagc gacagggcga agccctcgag ctgggtgccc tcgcccgtgg gctggcggcc	2340
50	gtctatggcc ctgcaaacgc gccagaaaacg ccgtcgaagc cgtgtcgag acaccgcggc	2400
	cggccggccgg cgttgtggat acctcgccga aaacttggcc ctcactgaca gatgagggc	2460
	ggacgttgac acttgagggg ccgactcacc cggcgccggcg ttgacagatg aggggcaggc	2520
55	tcgatttcgg cccggcgacgt ggagctggcc agcctcgcaa atcggcgaaa acgcctgatt	2580
	ttacgcgagt ttccccacaga tgcgtggac aagcctgggg ataagtgcac tgcggatttg	2640
60	acacttgagg ggcgcgacta ctgacagatg agggggcgcga tccttgacac ttgaggggca	2700
	gagtgcgtac agatgagggg cgccacattt gacatttgcg gggctgtcca caggcagaaa	2760
	atccagcatt tgcaagggtt tccgcccgtt tttcgccac cgctaaccctg tcttttaacc	2820
65	tgctttaaa ccaatattta taaaccttgtt ttttaaccag ggctgcgcggc tgcgcgtg	2880

1	accgcgcacg ccgaaggggg gtgccccccc ttctcgaacc ctcccggtcg agtgagcgag	2940
2	gaagcaccag ggaacagcac ttatataattc tgcttacaca cgatgcctga aaaaacttcc	3000
5	cttggggta tccacttatac cacgggata ttttataat tattttttt atagttttta	3060
6	gatcttcttt ttttagagcgc cttgtaggcc tttatccatg ctggtcttag agaaggtgtt	3120
10	gtgacaaatt gcccttcag tgtgacaaat caccctcaaa tgacagtctt gtctgtgaca	3180
11	aattgcctt aaccctgtga caaattgccc tcagaagaag ctgtttttc acaaagttat	3240
12	ccctgcttat tgactctttt ttathtagtg tgacaatcta aaaacttgc acacttcaca	3300
15	tggatctgtc atggcggaaa cagcggttat caatcacaag aaacgtaaaa atagcccg	3360
16	aatcgccag tcaaacgacc tcactgaggc ggcataatgt ctctccggg atcaaaaacg	3420
20	tatgctgtat ctgttcgttg accagatcgaaaatctgat ggcaccctac aggaacatga	3480
21	cggtatctgc gagatccatg ttgctaaata tgctgaaata ttcggattga cctctgcgga	3540
25	agccagtaag gatatacggc aggcatggaa gagtttcgcg gggaaaggaag tggttttta	3600
26	tcgcccgtaa gaggatgccc gcgatgaaaa aggctatgaa tctttcctt gtttatcaa	3660
27	acgtgcgcac agtccatcca gagggttttta cagtgtacat atcaacccat atctcattcc	3720
30	cttcttatac gggttacaga accggtttac gcagtttcgg cttagtgaaa caaaagaaat	3780
31	caccaatccg tatgccatgc gtttatacga atccctgtgt cagtagtgcgta agccggatgg	3840
35	ctcaggcatac gtctctctga aaatcgactg gatcatagag cgttaccagc tgccctcaaag	3900
36	ttaccagcgt atgcctgact tccgcgcgcg cttcctgcag gtctgtgtt atgagatcaa	3960
37	cagcagaact ccaatgcgc tctcatacat tgagaaaaag aaaggccgcg agacgactca	4020
40	tatcgatattt tcctccgcg atatcacttc catgacgaca ggatagtctg agggttatct	4080
41	gtcacagatt tgagggtggc tcgtcacatt tttctgacc tactgagggt aatttgcac	4140
45	agtttgctg tttccttcag cctgcatacgtt tttctcata cttttgaac tgtaatttt	4200
46	aaggaagcca aatttgaggg cagttgtca cagttgattt ctttctttt cccttcgtca	4260
50	tgtgacctga tatcggggt tagttcgtca tcattgtga ggggtgatta tcacagttta	4320
51	ttactctgaa ttggctatcc gcgtgtgtac ctctacctgg agttttccc acggtggtt	4380
55	tttcttcttg cgctgagcgt aagagctatc tgacagaaca gttcttctt gttcctcgc	4440
56	cagttcgctc gctatgctcg gttacacggc tgccggcagc gctagtgtata ataagtact	4500
60	gaggtatgtg ctcttctt ctcctttgt agtgttgctc ttatTTaaa caactttgcg	4560
61	gtttttgtat gactttgcga ttttgggtt gctttgcagt aaatttgcag atttaataaa	4620
62	aaaacgcggaaa gcaatgatta aaggatgttc agaatgaaac tcatggaaac acttaaccag	4680
63	tgcataaaacg ctggtcatga aatgacgaag gctatcgcca ttgcacagtt taatgtatgac	4740

	agcccggaag cgagaaaaat aaccggcgcc tggagaatag gtgaagcagc ggatttagtt	4800
	ggggtttctt ctcaggctat cagagatgcc gagaaagcag ggactacc gcacccggat	4860
5	atggaaattc gaggacgggt tgagcaacgt gttggttata caattgaaca aattaatcat	4920
	atgcgtgatg tggttggta gcgattgcga cgtgctgaag acgtatttcc accgggtgatc	4980
10	ggggttgctg cccataaaagg tggcgtttac aaaacctcag tttctgttca tcttgctcag	5040
	gatctggctc tgaagggct acgtgttttgc ctcgtggaaag gtaacgaccc ccagggaaaca	5100
	gcctcaatgt atcacggatg ggtaccagat cttcatattc atgcagaaga cactctccgt	5160
15	cctttatc ttggggaaaa ggacgatgtc acttatgcaa taaagccac ttgctggccg	5220
	gggcttgaca ttattccttc ctgtctggct ctgcaccgtt ttgaaactga gttaatggc	5280
20	aaatttgatg aaggtaaaact gcccaccgtt ccacacctga tgctccgact ggccattgaa	5340
	actgttgctc atgactatga tgtcatagtt attgacagcg cgccctaacct gggtatcggc	5400
25	acgattaatg tcgtatgtgc tgctgtatgtc ctgattgttc ccacgcctgc tgagttgttt	5460
	gactacacctt ccgcactgca gttttcgat atgctcgtt atctgctcaa gaacgttgc	5520
	cttaaagggt tcgagcctga tgtacgtatt ttgcttacca aatacagcaa tagcaatggc	5580
30	tctcagttccc cgtggatgga ggagcaaattt cgggatgcct gggaaagcat gttctaaaa	5640
	aatgttgatc gtgaaacgga tgaagttggtaa aaggtcaga tccggatgag aactgttttt	5700
35	gaacaggcca ttgatcaacg ctcttcaact ggtgcctgga gaaatgtct ttctatttgg	5760
	gaacctgtct gcaatgaaat ttgcgtatcgat ctgattaaac cacgctggga gattagataa	5820
	tgaagcgtgc gcctgttattt ccaaaacata cgctcaatac tcaaccgggtt gaagataactt	5880
40	cgttatcgac accagctgcc ccgatgggtt attcgtaat tgcgccgtt ggagtaatgg	5940
	ctcgccgttattt tgccattact ttgcctgtat gtggcgggaa tggtaagttt actcttgc	6000
45	tgctccgggg tgatagtgtt gagaagacctt ctcgggtatg gtcaggtat gaaacgtgacc	6060
	aggagctgct tactgaggac gcactggatg atctcatccc ttctttcta ctgactggc	6120
50	aacagacacc ggcgttcggt cgaagagtat ctgggtcat agaaattgcc gatgggagtc	6180
	gccgtctaa agctgctgca cttaccgaaa gtgattatcg tggtaatggat ggcgagctgg	6240
	atgatgagca gatggctgca ttatccagat tggtaacga ttatcgccca acaagtgc	6300
55	atgaacgtgg tcagcgat gcaagccat tgcagaatga atttgctgga aatatttctg	6360
	cgctggctga tgcggaaaaat atttcacgtt agattattac ccgctgtatc aacaccgcca	6420
60	aattgcctaa atcagttgtt gctctttttt ctcacccgg tgaactatct gcccggatc	6480
	gtgatgcact tcaaaaagcc tttacagata aagaggaattt acttaaggcag caggcatcta	6540
	accttcatga gcagaaaaaa gctggggta tatttgaagc tgaagaagttt atcactctt	6600
65	taacttctgt gcttaaaacg tcacatgtcat caagaacttag tttaaagctca cgacatcagt	6660

	ttgctctgg agcgacagta ttgtataagg gcgataaaat ggtgcttaac ctggacaggt	6720
	ctcggttcc aactgagtgt atagagaaaa ttgaggccat tcttaaggaa cttgaaaagc	6780
5	cagcacccctg atgcgaccac gtttagtct acgttatct gtcttactt aatgtccttt	6840
	gttacaggcc agaaagcata actggcctga atattctctc tgggcccact gttccacttg	6900
10	tatcgctggt ctgataatca gactgggacc acggtcccac tcgtatcgtc ggtctgatta	6960
	ttagtctggg accacggtcc cactcgatc gtcggctga ttattagtct gggaccacgg	7020
	tcccactcgt atcgctggtc tgataatcag actgggacca cggtcccact cgtatcgtc	7080
15	gtctgattat tagtctggg ccatggtccc actcgatcg tcggctgtat tattagtctg	7140
	ggaccacggt cccactcgta tcgtcggtct gattattagt ctggaaccac ggtcccactc	7200
20	gtatcgctgg tctgattatt agtctgggac cacggtccca ctcgtatcg cggtctgatt	7260
	attagtctgg gaccacgatc ccactcgatc tgtcggctcg attatcggtc tgggaccacg	7320
25	gtcccacttg tattgtcgat cagactatca gcgtgagact acgattccat caatgcctgt	7380
	caagggcaag tattgacatg tcgtcgtaac ctgtagaacg gagtaacctc ggtgtcggt	7440
	tgtatgcctg ctgtggattg ctgctgtgtc ctgcttatcc acaacatttt ggcacgggt	7500
30	atgtggacaa aatacctggt taccaggcc gtgccggcac gttaaccggg ctgcattccga	7560
	tgcaagtgtg tcgctgtcga cgagctcgac agctcgac tgaggttgcc ccgtattcag	7620
35	tgtcgctgat ttgtattgtc tgaagttgtt ttacgttaa gttgatgcag atcaattaat	7680
	acgataacctg cgtcataatt gattatttga cgtggtttga tggcctccac gcacgttgc	7740
	atatgttagat gataatcatt atcaactttac gggcccttcc cggtgatccg acaggttacg	7800
40	gggccccgac ctcgcgggtt ttgcgtatatt atgaaaattt tccggttaa ggcgtttccg	7860
	ttcttcttcg tcataactta atgttttat taaaatacc ctctgaaaag aaaggaaacg	7920
45	acaggtgctg aaagcgagct tttggcctc tgcgtttcc tttctctgtt tttgtccgtg	7980
	aatgaacaa tggaaagtccg agctcatcgac taataacttc gtatacgata cattatacga	8040
50	agttatattc gatgcggccg caaggggttc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc	8100
	tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa	8160
	ataccacaca gatgcgtaaag gagaaaatac cgcatcaggc gccattcgcc attcagctgc	8220
55	gcaactgttgc ggaaggccga tcgggtcgccc cctcttcgct attacgcccag ctggcgaaag	8280
	ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt	8340
60	gtaaaacgac ggccagtgaa ttgtataatcg actcaactata gggcgaattc gagctcggt	8400
	cccggggatc ctctagagtc gacctgcagg catgcaagct tattcaggct gcgcaactgt	8460
	tgggaaggcc gatcggtcgcc ggcctttcg ctattacgccc agctggcgaa agggggatgt	8520

	gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggtttccc agtcacgacg ttgtaaaacg	8580
	acggccagtg aattcgagct cggtaccagg ggatccctcta gaggaattca tccgccagtt	8640
5	catccggaa cggtctggc aggcaagtgc cgcaagtata catgaccgac ctgataacgt	8700
	ctggccttct tcgctcagta acgtttgtg tccaggacgt cagtctcac agctgtcaaa	8760
10	tcaacgctat ttcataaggc ggctcacgtt tttatgtcat gagccgcgt tttccggctg	8820
	gaacgttcca cccactcggt cactgtgatt taatatgcta aaccggttta attaagttt	8880
	gctttggagg gttttagcat gaatgcaaaa gtttgggttc tgggcgacgc ggtggtggac	8940
15	ctgctgccgg agagcgaagg ggcgcgtc cagtgcctg gaggcgcgc ggctaacgtg	9000
	gcggtagggg ttgcccgcct tggcggcaac agcggattta tcggccgcgt cggcggtgac	9060
20	ccgtttggcc gctacatgcg tcataccctg caacaggagc aggtcgacgt cagccatatg	9120
	tatctcgacg atcagcaccg cacgtccact gtggtcgtcg accttgacga ccagggggaa	9180
25	cgcacctta cctttatggt acgccccagc gcgacgtgt tcctggttga agaagacctg	9240
	ccacagtttgcg cggccggaca gtggttgcac gtctgctcca tcgcgctcag cggcgagccc	9300
	agccgttagca ctacccctgc ggcgatggag agcatcaggt ctggccggcgg tcgggtcaga	9360
30	tttggacccta atattcgtdcc cgatctctgg caggatcagg ctttgcgtc agcctgcctc	9420
	gatcgcgctt tgcacatggc caacgcggta aagctatcgg aagaggagct ggttttcatc	9480
35	agcagcagta atgatttagc atacgaaatc gccagcgtaa cggagcgtta tcagccagaa	9540
	ttgctactgg tgacccgggg caaagcgggg gtgcttgcgg cgttttagca gaagtttacc	9600
	catttcaacg cccggcctgt ggccagcgtg gacaccaccg ggcggggaga cgcatttgc	9660
40	gccggactgc tcgcccggct tgcggctaacc gggatgcacaa cggacatgac cgcactggaa	9720
	ccgacactca cgcttgcaca gacctgcggc gccctggcca ccacagccaa aggtgcgtatg	9780
45	accgccttgc cttatcagcg cgatctcaac cgtcagttt aatccttaaa gccgccttgc	9840
	gcggctact ttgttgcattt catcacattt attaaaccgg tttagcatat ttgttttaag	9900
	aaaaacaaag gtcgggctta gcatagcgcc taaaccgggt tagaaaaat tataatttc	9960
50	cattttact ttggatgc caacagcatg tacagaaaaaa gcacacttgc gatgcttatac	10020
	gctttgcataa ccagcgctgc ctcagccat ggcacaaacgg atataagcac cattgaagcc	10080
55	cgactcaacg cgctggaaaa acgcctgcag gaggcagaaaa acaggcgcac aacggcgaa	10140
	aaccgcgcgg gggcggcgga gaaaaaagtt cagcaactca cgcgcagca gcaaaaaaac	10200
60	cagaactcga ctcaggaagt ggctcagcgt accgcccagac ttgagaaaaa agccgatgac	10260
	aaaagcggat ttgagttca cggttacgcc cgctccggcg tgataatgaa tgattccggc	10320
	gccagcacca aatccggagc ctacataacg cccgcagggtg aaaccggcg agctatcgac	10380
65	cgtctggaa accaggccga tacctatgtt gaaatgaaatc ttgaacataa gcagaccctg	10440

	gataatgggg ccacgacccg cttaaggtg atggtcgccc acgggcaaac ctcttataac	10500
	gactggactg caagcattag cgatctgaac gttcgtcagg ccttgcga attggtaac	10560
5	ctgcccacgt tcgctggcc atttaaggc tccaccctgt gggccggaa acgttgcac	10620
	cgcgacaatt tcgatattca ctggattgac tctgatgtcg tgttcctcgc cggtaccggt	10680
10	ggtgttatct atgacgtgaa gtggAACGAC ggcctgcgg aataatttc cctgtacggg	10740
	cgttaactcg gcgacattga tgattccagc aacagcgtgc agaactatac cctcaccatg	10800
	aatcacttcg caggtccgct gcagatgtat gtcagcggc tgccgtctgc gggcgaaggaa	10860
15	taacgacgag cgtaaagata gcaacggcaa tctggtaaaa ggcgatgcgg caaacaccgg	10920
	cgtgcacatgc ctgctcgcc tgcataacga cagtttctac ggcctgcgc acggtagcag	10980
20	taaaaaccgct ctgctttatg gtcatggct gggcgcagag gttaaaggta tcggatctga	11040
	tggcgcactt cgtccggag ccgacacatg ggcattgcc agttacggca ccacgcccgt	11100
25	cagcgaaaac tggctctgtt cccggcaat gctggcgcaa cgcagtaaag accgctatgc	11160
	cgatggcgac agctatcgt gggcaacatt caacctgcgt ctgattcagg caatcaatca	11220
	gaatttcgct ctcgcctacg gaggcagcta ccagttacatg gatcttaaac ccgaaggta	11280
30	taacgatcgt caggcggta acggtagctt ctacaagctc accttcgccc cgacattaa	11340
	ggtcggcagt attgggtatt tcttcagtcg cccggagatt cgtttctata ctcctggat	11400
35	ggactggagc aaaaaactga ataattacgc cagcgacgac gccctggca gtgacggttt	11460
	taactcgggc ggcgaatggc ctggcgtgt gcagatggaa acctgggtct gacggcttac	11520
	gcctgatgac aggaatagcc gggggtcaga gcatctttgt caccggac tcaactaaga	11580
40	cgcagaaaaa ggcgtcccgta acgcgcggc acgttttttttta agccttaaga	11640
	gggtactatg gatttgaac agatttcctg ctcgcgtctt ccgcttctt gaggcaaaaga	11700
45	aaatatcgcc agcgccgcg actgcgccac gcgcctgcgc ctgggtctgg tcgtatgttc	11760
	gctggccgac cagcaggcca tcggcaaaagt tgaagggttg aagggtgtt ttcgtaatgc	11820
50	cggacagatg cagattattt tcggcaccgg ggtggtaaat aagggtctacg ctgccttac	11880
	tcaggcggcg ggtattagcg aatccagcaa atcggaaagcc ggcacatttgc gggcaaaaaaa	11940
	gctcaatccg ttccagcgca tcgccccct gctatcaaac atcttcgtgc cgataatccc	12000
55	tgccatcgta gcctctggtc tgctgatggg cctgctggaa atggtaaaaa catacggtcg	12060
	ggttgaccccg ggcaacgcca tctacatcat gctggatatg tgcagctcgg cggcatttat	12120
60	cattctgccc attctgattt gctttaccgc cgccccgcgaa ttccggcggta atccttatact	12180
	cggcgcgacg cttggcggca ttctgactca tccagcgctg actaaccgcct gggcgtggc	12240
	cgcgggtttc cacccatga acttttcgg ctgcggaaatt gccatgatcg gctatcagg	12300

	tacgggtttc ccggtaactgc tggcagttatg gtttatgagc atcggttggaa agcagttgcg	12360
	tcgcgcaatc cccgatgccc tggatttgat cctgacgccc ttccctgacgg tgattatatac	12420
5	cggttttatac gccctgttga ttatcgcccc ggccgggtcg gcactgggcg acggtatctc	12480
	gtttgtcctc agcaccctga ttagccacgc cggctggctc gccgggttac tgtttggcgg	12540
10	tctctattca gttatcgta ttaccggat tcatcacagc ttccatgcgg ttgaagccgg	12600
	gttgctggc aatccctcca tcggcgtcaa cttcctgctg ccgatttggg cgatggccaa	12660
	cgtcgctcag ggcggagcct gtctggcggt gtggttcaaa accaaagatg caaaaattaa	12720
15	agccattact ctgcccctgg cgtttccgc catgctggc atcaccgagg cggcgatttt	12780
	tggtatttaac ctgcgcattt tgaagccatt tattgcggcg ctgattggc gtgcggcggg	12840
20	cggcgcatgg gtggtatctg tacacgtcta catgaccgcg gtcggcttga cagcgatccc	12900
	cggcatggcc atcgtgcagg ccagttcgct gttgaactac attatcgaaa tggttatcgc	12960
25	ctttggcgtc gcctttacgg tctccctggg tttgaaatac aaaacggacg ctgaataatg	13020
	tctttccat cacgactgcc tgcgatttt caggccgtaa tgcagggcca gccgcgcgac	13080
	ctggccgata gccactatcc gcgctggcac catgcgcggg tcacoggct gatgaacgcac	13140
30	cccaacggct ttatcgaaatt tgccggacgc tatcatctgt tttatcagtg gaacccgctc	13200
	gcctgcgatc atacgtttaa gtgctggcg cactggagtt ccatcgatct gctgcactgg	13260
35	cagcatgagc ccattgcgct gatgcggac gaagagtatg accgtaacgg ctgctactcc	13320
	ggcagcgcgg tggataacaa cggtaacgctt accctgtgct ataccggcaa cgtgaagttt	13380
	gccgagggag ggcgaaccgc ctggcaatgc ctggcaacgg aaaacgctga cggcaccttc	13440
40	cgcaaaatcg gtccggctt gcccgtggc gagggttaca cccggcacgt gcgacccca	13500
	aaagtctggc gacacgaaga cctgtggatc atgggtctgg gcgccgagg tcggcaaaag	13560
45	cgcggcaagg tgctgctgtt cagctctgcg gatctccatc agtggacgag tatgggtgaa	13620
	atcgccggcc acggcatcaa tggcctcgac gacgtggct atatgtgggaa gtgcccggat	13680
50	ctttttccac tcggcgacca gcatattcta acctgctgtc cgcagggtt gtcggcgat	13740
	gaagagtgct acctgaacac ctacccggca gtatggatgg cggcgagtt tgattacgct	13800
	gctggcgctt tcagacacgg cgaactgcac gaactggacg cccgggttga gttctacgcc	13860
55	ccgcaaacca tgcttaccag tggatggccgt cgtctgctgg tcggctggat gggcgccg	13920
	gagggcgaag agatgcttca gccgaccctg aacaacggct ggatccatca gatgacctgc	13980
60	ctgcgtgagc tggagttat caacggtcag ctctatcagc gtccgctacg ggaactgagc	14040
	gccctgcgcg gtgaagcgaa cggctggatcg gggAACGCCG tgccgctggc gccgatggaa	14100
	atcgattgc aaacccgcgg gggcgatatg ttgagcctcg attttggcgg cgtattaaacc	14160
65	cttggagtgcg atgcccggcgg actccgcctg gcccgcacgc gtctcgccag tgacgagatg	14220

	cattatcgtt actggcgccgg aaacgtccgc tcgctgcgtg ttttcatcga ccagtcgagc	14280
	gtggagattt tcataaacgg cggtgaaggg gtgatgagca gccgctactt cccggcctgc	14340
5	tccggtcagc taacattctc cggcatcacg ccggacgcat tctgctactg gccgctgcga	14400
	acttgcatgg tagaataagc gtttgcttc aggctcatgg cgtcgtaatg aaaaccaaac	14460
10	gcgtaaccat taaagatata gccgaacagg ctggcgtctc caaagcgacc gccagcttgg	14520
	tactgaatgg tcgtggcaag gagctgcgcg tggcgcagga aacgogtgag cgctactgt	14580
	cgattgcccgt taagcatcac tatcagccaa gcattcatgc ccgctcgctg cgcaacaacc	14640
15	gcagccacac catcgggctg gtggtgccgg agatcaccaa ccacggctt gcggcttttg	14700
	cccatgagct ggagatgctg tgccgcgagg cgggcgtcca gctgttgatc tcttgactg	14760
20	atgaaaaccc cggtcaggag agcgtggtgg tcaataatat gattgcccgc caggtcgacg	14820
	ggatgatcgt cgcttcctgt atgcacaacg atgcccacta tctcaaattc agccaacagc	14880
25	tgccagtggt gctgtttgac cggtgcccca atgaaagcgc gctgcgcgtg gtaatgaccg	14940
	attcgattac cccaacggcg gaactgattt cccgcacatgc gcctcagcat agcgatgagt	15000
	tctggttttt aggccgtcag ggcgcgtctgt cgccctcccg cgatcgtctg accgggttca	15060
30	cgcagggttt ggctcaggcg ggtattgccc tgccgcgggaa atgggtgatc aacggcaatt	15120
	accaccccaag ctccggctat gagatgtttg ccgcactctg cgccgcgcctt gggcggccgc	15180
35	ctaaggcgct attcaccgccc gcctgcgggc tgctcgaagg ggttatgcgc tatatgagcc	15240
	agcaccattt actcgattcc gatattcatc tgacgagctt tgacgatcac tatctttatg	15300
	attcgctgtc gctgcgtatc gacactgtcc agcaggataa tcgcccagctg g	15351
40		

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo del género *Escherichia* que tiene capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico, en el que se mejora una actividad del complejo de α -cetoglutarato deshidrogenasa en comparación con un nivel de actividad endógena del mismo.

5 2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa comprende secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 24.

10 3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una actividad de la homoserina O-succiniltransferasa se mejora aún más en comparación con un nivel de actividad endógena de la misma.

15 4. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad de al menos una de la cistationina gamma-sintasa y la homoserina quinasa, se debilita aún más en comparación con los niveles correspondientes de actividad endógena, o se elimina.

5 5. El microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.

20 6. Un procedimiento de producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico, que comprende:

25 cultivar un microorganismo del género *Escherichia* que tiene capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico en un medio, en el que se mejora una actividad del complejo de α -cetoglutarato deshidrogenasa en comparación con un nivel de actividad endógena del mismo; y

recuperar O-succinilhomoserina o ácido succínico de los medios de cultivo o del microorganismo cultivado.

30 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

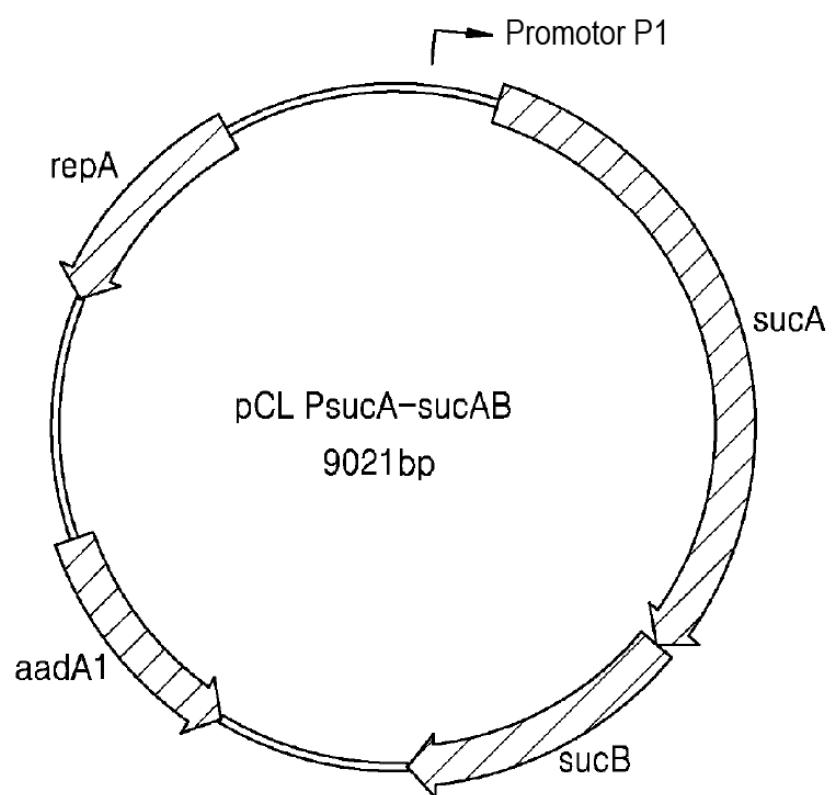


FIG. 2

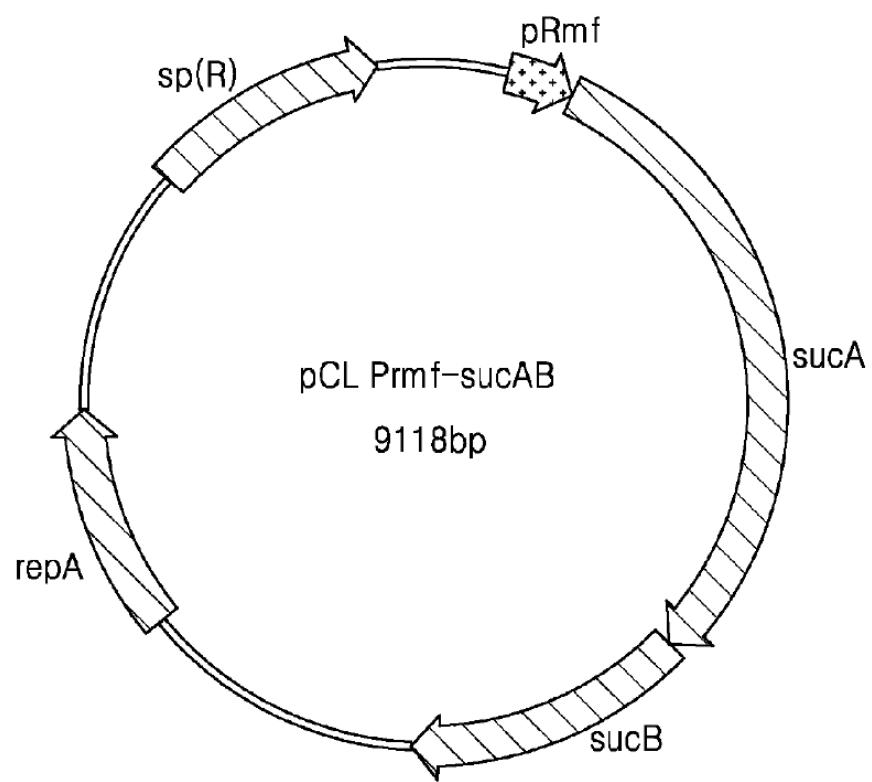


FIG. 3

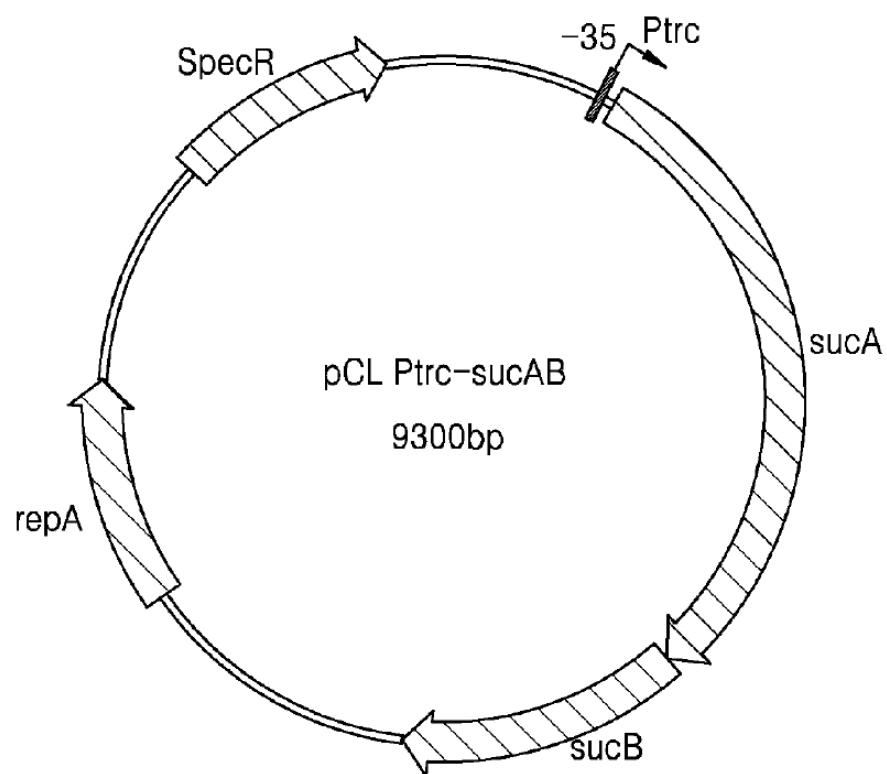


FIG. 4

