

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

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

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

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

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

54 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**

30 Prioridad:

03.06.2014 KR 20140067787

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

05.12.2019

73 Titular/es:

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

72 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**

74 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

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.

Técnica antecedente

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. Skorofkhodova, et al., Applied Biochemistry and Microbiology (Bioquímica y Microbiología Aplicadas), diciembre de 2013, Vol. 49, Ejemplar 7, pp. 629-637).

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.

Descripción detallada del problema técnico concepto inventivo

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

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.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto del concepto inventivo, se proporciona un microorganismo que tiene la capacidad de producir O-succinilhomoserina o ácido succínico.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

En una realización de la presente divulgación, el promotor puede ser Ptac, P_{trc}, P_{pro}, P_R, P_L, P_{rmf} o P_{cysK}, 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.

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.

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 O-homoserina no se convierte en O-fosfohomoserina o, si se convierte, la tasa de conversión es muy baja.

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.

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.

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.

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.

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).

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 palmítico, 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.

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 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.

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 posibilidades de conversión enzimática o química.

Descripción de los dibujos

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

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

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.

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

1) Deleción del gen metB

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

El gen metB que codifica la cistationina gamma-sintasa en la cepa W3110 de *E. coli* (K12) de tipo salvaje se deleccionó. 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 deleccionar el gen metB, se realizó el procedimiento de deleción de PCR por FRT en un solo paso (PNAS (2000), Vol. 97, p6640-6645). Para deleccionar 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 resultado la construcción de un cassette de deleción.

SEQ ID NO: 12;

5'-TTACTCTGGTGCCTGACATTTACCGACAAAGCCCAGGGAAGTTCA
TCACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'

SEQ ID NO: 13;

5'-CGCTGCGCCAGCTCCATACGCGGCACCAGCGTTTCGCAACCCACGT

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 deletionó.

SEQ ID NO: 14; 5'-TATTCGCCGCTCCATTCAGC-3'

SEQ ID NO: 15; 5'-TACCCCTTGTTCGAGCCCG-3'

La cepa con el gen *metB* deletionado 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* deletionado, que muestra una banda contraída en gel de agarosa al 1,0%. Se confirmó la delección del marcador de cloranfenicol. La cepa auxotrófica metionina obtenida se denominó CC03-0132.

2) Delección del gen *thrB*

Con el fin de aumentar la producción de O-succinil homoserina a partir de la homoserina, *thrB*, se deletionó el gen que codifica la homoserina quinasa. En particular, cuando se usa una cepa productora de treonina, la delección de este gen es necesaria porque la actividad de utilización de la homoserina es muy fuerte. Para deletionar el gen *thrB* de la cepa CC03-0132 construida en 1) más arriba, se realizó el procedimiento de delección de PCR por FRT en un solo paso (PNAS (2000) Vol. 97, p6640-6645). Para deletionar 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 delección.

SEQ ID NO: 16;

5'-CATGGTTAAAGTTTATGCCCCGGCTTCCAGTGCCAATATGAGCGTC
GGGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'

SEQ ID NO: 17;

5'-GGAGATACCGCTCGCTACCGCGCCGATTTCGCGACCGCCTGCC
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 deletionó.

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

SEQ ID NO: 19; 5'-ACGCCGAGAGGATCTTCGCAG-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.

3) Construcción del vector pSG para insertar metA11

La homoserina succinil transferasa está bajo control de retroalimentación por medio de metionina traza añadida al 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 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 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'-ggccgaattcatgcccattcggtgccgga-3'

SEQ ID NO: 21; 5'-ggccgagttcttaattccagcgttgattca-3'

La PCR se realizó utilizando pfu-X ADN polimerasa (Solgent, SPX16-R250) de la siguiente manera: desnaturalización 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 desnaturalización 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.

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 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 delecionó a partir de la misma. Esta cepa se denominó *E. coli* CC03-0038.

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 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.

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*.

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

SEQ ID NO: 2; 5'-GGCCTCTAGATGTCCATCCTTCAGTAATCG-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: desnaturalización 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 desnaturalización 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.

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.

SEQ ID NO: 3; 5'-ATCATGCGAAGCAGCGCTTTGAA-3'

SEQ ID NO: 4; 5'-GGCCAAGCTTTGTCCATCCTTCAGTAATCG-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: desnaturalización 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 desnaturalización 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.

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.

SEQ ID NO: 7; 5'-GAGTGCGATATC atgccgattcggtgccggac-3'

SEQ ID NO: 8; 5'-GCACTCAAGCTT ttaatccagcgttgatacatg-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: 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 desde la desnaturalización 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'-GGCCAAGCTTGCATCAGGCGTAACAAAGAA-3'

SEQ ID NO: 11; 5'-GGCCAAGCTTTGTCCATCCTTCAGTAATCG-3'

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: desnaturalización 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 desnaturalización 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 vector recombinante pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB. La Figura 4 es un diagrama esquemático que ilustra el vector recombinante pCL_Pcysk-metA11_PsucA-sucAB.

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 espectinomicina, 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 en el medio que tiene la composición mostrada en la Tabla 2 a continuación para la evaluación de la producción de ácido succínico.

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 espectinomicina, 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.

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 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.

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

Composición	Sol. madre	Cono (por litro)	Vol (ml)
Azúcar en bruto		60g	200
KH ₂ PO ₄		2 g	100
Sulfato de amonio		25g	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 3. Producción de ácido succínico mediante cultivo en matraz utilizando glucosa

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

Cepa	Azúcar 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.

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.

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 espectinomicina, 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 *Salmonella* 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 espectinomicina, 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 OD₆₀₀ = 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.

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 descendentemente. 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 rápidamente.

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

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
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

Cepa	O-succinil homoserina (g/l)	Glutamato (g/l)	Homoserina (g/l)
CC03-0038/pCC1 BAC-scrO/pCL1920	7,0	1,87	0,7
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
CJM2-A11/pCC1BAC-scrO/pCL_Pcysk-metA11_Pna-sucAB	22,6	0,0	0,54

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-succinil homoserina, 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	
30	ggccaagctt gcatcaggcg taacaagaa	30
	<210> 2	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para Psuc_sucAB	
40	<400> 2	
	ggcctctaga tgtccatcct tcagtaatcg	30
	<210> 3	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para sucAB	
50	<400> 3	
	atcatgcaga acagcgcttt gaa	23
	<210> 4	
55	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador directo para sucAB	
	<400> 4	
	ggccaagctt tgtccatcct tcagtaatcg	30
65	<210> 5	

ES 2 734 412 T3

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

5 <220>
<223> pCL_Prmf-gfp

<400> 5

10	atcgaatcaa agctgccgac aacacgggag ccagtgcgcg cccccgtggg gaaaaaatca	60
	tggcaattct ggaagaaata gcgctttcag ccggcaaacc ggctgaagcc ggatctgcga	120
	ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccggtggga	180
15	attaattccc ctgctcgcgc aggctgggtg ccaagctctc gggtaacatc aaggcccgat	240
	ccttgagagcc cttgccctcc cgcacgatga tcgtgccgtg atcgaaatcc agatccttga	300
20	ccgcgagttg caaacctca ctgatccgca tgcccgttcc atacagaagc tgggcgaaca	360
	aacgatgctc gccttccaga aaaccgagga tgcgaaccac ttcacccggg gtcagcacca	420
	ccggcaagcg ccgcgacggc cgaggtcttc cgatctcctg aagccagggc agatccgtgc	480
25	acagcacctt gccgtagaag aacagcaagg ccgccaatgc ctgacgatgc gtggagaccg	540
	aaaccttgcg ctcgttcgcc agccaggaca gaaatgcctc gacttcgctg ctgcccagg	600
30	ttgccgggtg acgcacaccg tggaacgga tgaaggcagc aaccagtggt acataagcct	660
	gttcggttcg taagctgtaa tgcaagtagc gtatgcgctc acgcaactgg tccagaacct	720
	tgaccgaacg cagcgggtgt aacggcgagc tggcggtttt catggcttgt tatgactgtt	780
35	tttttggggg acagtctatg cctcgggcat ccaagcagca agcgcgttac gccgtgggtc	840
	gatgtttgat gttatggagc agcaacgatg ttacgcagca gggcagtcgc cctaaaacaa	900
40	agttaaacad catgagggaa gcggtgatcg ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag	960
	ttggcgatcat cgagcgccat ctgcaaccga cgttgctggc cgtacatttg tacggctccg	1020
45	cagtggatgg cggcctgaag ccacacagtg atattgattt gctggttacg gtgaccgtaa	1080
	ggcttgatga aacaacgcgg cgagctttga tcaacgacct tttggaaact tcggcttccc	1140
	ctggagagag cgagattctc cgcgctgtag aagtcaccat tgttggtgcac gacgacatca	1200
50	ttccgtggcg ttatccagct aagcgcgaac tgcaatttgg agaattggcag cgcaatgaca	1260
	ttcttgagag tatcttcgag ccagccacga tcgacattga tctggctatc ttgctgacaa	1320
55	aagcaagaga acatagcggt gccttggtag gtccagcggc ggaggaactc tttgatccgg	1380
	ttcctgaaca ggatctatct gaggcgctaa atgaaacctt aacgctatgg aactcgccgc	1440
	ccgactgggc tggcgatgag cgaaatgtag tgcttacgtt gtcccgcatc ttggtacagcg	1500
60	cagtaaccgg caaatcgcg ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaatg gagcgccctgc	1560

65

ES 2 734 412 T3

	cggcccagta	tcagcccgtc	atacttgaag	ctagacaggc	ttatcttggga	caagaagaag	1620
	atcgcttggc	ctcgcgcgca	gatcagttgg	aagaatttgt	ccactacgtg	aaaggcgaga	1680
5	tcaccaaggt	agtcggcaaa	taatgtctaa	caattcgttc	aagccgacgc	cgcttcgcgg	1740
	cgcggcttaa	ctcaagcggt	agatgcacta	agcacataat	tgtcacagc	caaactatca	1800
10	ggtcaagtct	gcttttatta	tttttaagcg	tgcataataa	gccctacaca	aattgggaga	1860
	tatatcatga	aaggctggct	ttttcttggt	atcgcaatag	ttggcggaagt	aatcgcaaca	1920
	tccgcattaa	aatctagcga	gggctttact	aagctcgtca	gcgggtgttg	gcgggtgtcg	1980
15	gggctggctt	aactatgcgg	catcagagca	gattgtactg	agagtgcacc	atatgcgggtg	2040
	tgaaataccg	cacagatgcg	taaggagaaa	ataccgcatac	aggcgccatt	cgccattcag	2100
20	gctgcgcaac	tgttggaag	ggcgatcggg	gcgggcctct	tcgctattac	gccagctggc	2160
	gaaaggggga	tgtgctgcaa	ggcgattaag	ttgggtaacg	ccagggtttt	cccagtcacg	2220
	acgttgtaaa	acgacggcca	gtgaattcga	gctcggtagc	caggaagccg	cttctattgc	2280
25	acaagagata	aagcgtctac	cttaattata	aagatttgta	aatataaccg	tctccggtat	2340
	gttgccctgag	gcgggtttttt	tgtctctaac	gtgcggaaaa	atttgttcct	cttcacattt	2400
30	tttgtacaac	cgacatgcc	gtgtagctca	caaatatgac	agtggcgtga	atthttgcgca	2460
	ttgacggcag	ttatgattcg	cggtattgct	taactgtgat	tgcacattta	gtaatcactg	2520
	ttttcttttc	caccagaaac	cagtatgagg	gaaagatatc	atgagtaaag	gagaagaact	2580
35	tttactgga	gttgtcccaa	ttcttggtga	attagatggg	gatgttaatg	ggcacaaatt	2640
	ttctgtcagt	ggagaggggtg	aaggatgatgc	aacatacggg	aaacttacct	ttaaatttat	2700
40	ttgcactact	ggaaaactac	ctgttccatg	gccaaacttt	gtcactactt	tctcttatgg	2760
	tgttcaatgc	ttttcccgtt	atccggatca	tatgaaacgg	catgactttt	tcaagagtgc	2820
45	catgcccga	ggttatgtac	aggaacgcac	tatatctttc	aaagatgacg	ggaactacaa	2880
	gacgcgtgct	gaagtcaagt	ttgaagggtga	tacccttggt	aatcgatatc	agttaaaagg	2940
	tattgattht	aaagaagatg	gaaacattct	cggacacaaa	ctcgagtaca	actataactc	3000
50	acacaatgta	tacatcacgg	cagacaaaca	aaagaatgga	atcaaagcta	acttcaaat	3060
	tcgccacaac	attgaagatg	gatccgttca	actagcagac	cattatcaac	aaaatactcc	3120
55	aattggcgat	ggccctgtcc	ttttaccaga	caaccattac	ctgtcgacac	aatctgcct	3180
	ttcgaaagat	cccaacgaaa	agcgtgacca	catggctcct	cttgagtttg	taactgctgc	3240
	tgggattaca	catggcatgg	atgagctcta	caaataactg	caggcatgca	agcttggcgt	3300
60	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	attgttatcc	gtcacaatt	ccacacaaca	3360
	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	ggggtgccta	atgagtgagc	taactcacat	3420
65	taattgcgtt	gcgctcactg	cccgttttcc	agtcgggaaa	cctgtcgtgc	cagctgcatt	3480

ES 2 734 412 T3

	aatgaatcgg ccaacgcgaa ttcccgacag taagacgggt aagcctggtg atgataccgc	3540
	tgccttactg ggtgcattag ccagtctgaa tgacctgtca cgggataatc cgaagtggtc	3600
5	agactggaaa atcagagggc aggaactgct gaacagcaaa aagtcagata gcaccacata	3660
	gcagacccgc cataaaacgc cctgagaagc cctgtacggg cttttcttgt attatgggta	3720
10	gtttccttgc atgaatccat aaaaggcgcc tgtagtgcca ttaccccca ttactgcca	3780
	gagccgtgag cgcagcgaac tgaatgtcac gaaaaagaca gcgactcagg tgccgtgatgg	3840
	tccggagacaa aaggaatatt cagcgatttg cccgagcttg cgagggtgct acttaagcct	3900
15	ttagggtttt aaggtctggt ttgtagagga gcaaacagcg tttgcgacat ctttttgtaa	3960
	tactgcgga ctgactaaag tagtgagtta tacacagggc tgggatctat tctttttatc	4020
20	tttttttatt ctttctttat tctataaatt ataaccactt gaatataaac aaaaaaaca	4080
	cacaaaggtc tagcgggaatt tacagagggg ctagcagaat ttacaagttt tccagcaaag	4140
	gtctagcaga atttacagat acccacaact caaaggaaaa ggactagtaa ttatcattga	4200
25	ctagcccatc tcaattggta tagtgattaa aatcacctag accaattgag atgtatgtct	4260
	gaattagttg ttttcaaagc aaatgaacta gcgattagtc gctatgactt aacggagcat	4320
30	gaaaccaagc taattttatg ctgtgtggca ctactcaacc ccacgattga aaacctaca	4380
	aggaaagaac ggacggatc gttcacttat aaccaatacg ctcagatgat gaacatcagt	4440
35	agggaaaatg cttatggtgt attagctaaa gcaaccagag agctgatgac gagaactgtg	4500
	gaaatcagga atcctttggt taaaggcttt gagattttcc agtggacaaa ctatgccaaag	4560
	ttctcaagcg aaaaattaga attagttttt agtgaagaga tattgcctta tcttttccag	4620
40	ttaaaaaat tcataaaata taatctggaa catgttaagt cttttgaaaa caaatactct	4680
	atgaggatth atgagtgggt attaaaagaa ctaacacaaa agaaaactca caaggcaa	4740
45	atagagatta gccttgatga atttaagttc atgttaatgc ttgaaaataa ctaccatgag	4800
	tttaaaaggc ttaaccaatg ggttttgaaa ccaataagta aagatttaaa cacttacagc	4860
	aatatgaaat tgggtggtga taagcgaggc cgcccgactg atacgttgat tttccaagtt	4920
50	gaactagata gacaaatgga tctcgtaacc gaacttgaga acaaccagat aaaaatgaat	4980
	ggtgacaaaa taccaacaac cattacatca gattcctacc tacataacgg actaagaaaa	5040
55	acactacagc atgctttaac tgcaaaaatt cagctcacca gttttgaggc aaaatthttg	5100
	agtgacatgc aaagtaagta tgatctcaat ggttcgttct catggctcac gcaaaaacaa	5160
	cgaaccacac tagagaacat actggctaaa tacggaagga tctgaggttc ttatggctct	5220
60	tgtatctatc agtgaagcat caagactaac aaacaaaagt agaacaactg ttcaccgtta	5280
	catatcaaag ggaaaactgt ccatatgcac agatgaaaac ggtgtaaaaa agatagatac	5340
65		

ES 2 734 412 T3

	atcagagctt ttacgagttt ttggtgcatt caaagctggt caccatgaac agatcgacaa	5400
	tgtaacagat gaacagcatg taacacctaa tagaacaggt gaaaccagta aaacaaagca	5460
5	actagaacat gaaattgaac acctgagaca acttggttaca 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 aatataaaca aaaaaaacac acaaaggtct	60
20	agcgggaattt acagagggtc tagcagaatt tacaagtttt ccagcaaagg tctagcagaa	120
	tttacagata cccacaactc aaaggaaaag gactagtaat tatcattgac tagcccatct	180
25	caattgggtat agtgattaaa atcacctaga ccaattgaga tgtatgtctg aattagttgt	240
	tttcaaagca aatgaactag cgattagtcg ctatgactta acggagcatg aaaccaagct	300
	aatttttatgc tgtgtggcac tactcaaccc cagcattgaa aaccctacaa ggaaagaacg	360
30	gacgggtatcg ttcacttata accaatacgc tcagatgatg aacatcagta gggaaaatgc	420
	ttatggtgta ttagctaaag caaccagaga gctgatgacg agaactgtgg aaatcaggaa	480
35	tcctttgggt aaaggctttg agattttcca gtggacaaac tatgccaaagt tctcaagcga	540
	aaaattagaa ttagttttta gtgaagagat attgccttat cttttccagt taaaaaaatt	600
	cataaaatat aatctggaac atgttaagtc ttttgaaaac aaatactcta tgaggattta	660
40	tgagtgggtta ttaaaagaac taacacaaaa gaaaactcac aaggcaaata tagagattag	720
	ccttgatgaa tttaagttca tgtaaatgct tgaaaataac taccatgagt ttaaaaggct	780
45	taaccaatgg gttttgaaac caataagtaa agattttaaac acttacagca atatgaaatt	840
	ggtgggtgat aagcgaggcc gcccgactga tacgttgatt ttccaagttg aactagatag	900
50	acaaatggat ctcgtaaccg aacttgagaa caaccagata aaaatgaatg gtgacaaaat	960
	accaacaacc attacatcag attcctacct acataacgga ctaagaaaaa cactacacga	1020
	tgctttaact gcaaaaattc agctcaccag ttttgaggca aaatttttga gtgacatgca	1080
55	aagtaagtat gatctcaatg gttcgttctc atggctcacg caaaaacaac gaaccacact	1140
	agagaacata ctggctaaat acggaaggat ctgaggttct tatggctctt gtatctatca	1200
60	gtgaagcatc aagactaaca aacaaaagta gaacaactgt tcaccgttac atatcaaagg	1260
	gaaaactgtc catatgcaca gatgaaaacg gtgtaaaaaa gatagataca tcagagcttt	1320
65		

ES 2 734 412 T3

	tacgagtttt	tggtgcattc	aaagctgttc	accatgaaca	gatcgacaat	gtaacagatg	1380
	aacagcatgt	aacaccta	agaacaggtg	aaaccagtaa	aacaaagcaa	ctagaacatg	1440
5	aaattgaaca	cctgagacaa	cttggttacag	ctcaacagtc	acacatagac	agcctgaaac	1500
	aggcgatgct	gcttatcgaa	tcaaagctgc	cgacaacacg	ggagccagtg	acgcctcccg	1560
10	tggggaaaaa	atcatggcaa	ttctggaaga	aatagcgctt	tcagccggca	aaccggctga	1620
	agccggatct	gcgattctga	taacaaacta	gcaacaccag	aacagcccg	ttgcgggcag	1680
	caaaacccgt	gggaattaat	tcccctgctc	gcgcaggctg	ggtgccaaagc	tctcgggtaa	1740
15	catcaaggcc	cgatccttgg	agcccttgcc	ctccgcacg	atgatcgctg	cgtgatcgaa	1800
	atccagatcc	ttgaccgcga	gttgcaaacc	ctcactgatc	cgcatgcccg	ttccatacag	1860
20	aagctggg	aacaaacgat	gctcgccttc	cagaaaaccg	aggatgcgaa	ccacttcatc	1920
	cggggtcagc	accaccggca	agcgccgcga	cggccgaggt	cttccgatct	cctgaagcca	1980
	gggcagatcc	gtgcacagca	ccttgccgta	gaagaacagc	aaggccgcca	atgcctgacg	2040
25	atgcgtggag	accgaaacct	tgcgctcg	cgccagccag	gacagaaatg	cctcgacttc	2100
	gctgctgccc	aaggttgccg	ggtgacgcac	accgtggaaa	cggatgaagg	cacgaaccca	2160
30	gtggacataa	gcctgttcgg	ttcgtaagct	gtaatgcaag	tagcgatatg	gctcacgcaa	2220
	ctggtccaga	accttgaccg	aacgcagcgg	tggtaacggc	gcagtgccgg	ttttcatggc	2280
35	ttgttatgac	tggttttttg	gggtacagtc	tatgcctcgg	gcatccaagc	agcaagcgcg	2340
	ttacgccgtg	ggtcgatgtt	tgatgttatg	gagcagcaac	gatgttacgc	agcagggcag	2400
	tcgccctaaa	acaaagttaa	acatcatgag	ggaagcggtg	atcgccgaag	tatcgactca	2460
40	actatcagag	gtagttggcg	tcacgcagcg	ccatctcgaa	ccgacgttgc	tggccgtaca	2520
	tttgtacggc	tccgcagtg	atggcggcct	gaagccacac	agtgatattg	atttgcctgg	2580
45	tacggtgacc	gtaaggcttg	atgaaacaac	gcggcgagct	ttgatcaacg	accttttgga	2640
	aacttcggct	tcccctggag	agagcgagat	tctccgcgct	gtagaagtca	ccattgttgt	2700
	gcacgacgac	atcattccgt	ggcgttatcc	agctaagcgc	gaactgcaat	ttggagaatg	2760
50	gcagcgcaat	gacattcttg	caggtatctt	cgagccagcc	acgatcgaca	ttgatctggc	2820
	tatcttgctg	acaaaagcaa	gagaacatag	cgttgccttg	gtaggtccag	cggcggagga	2880
55	actctttgat	ccggttcctg	aacaggatct	atttgaggcg	ctaaatgaaa	cottaacgct	2940
	atggaactcg	ccgcccga	gggctggcga	tgagcgaaat	gtagtgttta	cgttgtcccg	3000
	catttggtac	agcgagtaa	ccggcaaaat	cgcgccgaag	gatgtcgctg	ccgactgggc	3060
60	aatggagcgc	ctgccggccc	agtatcagcc	cgtcatactt	gaagctagac	aggcttatct	3120
	tggacaagaa	gaagatcgct	tggcctcgcg	cgcatatcag	ttggaagaat	ttgtccacta	3180
65	cgtgaaaggc	gagatcacca	aggtagtcgg	caaataatgt	ctaacaattc	gttcaagccg	3240

ES 2 734 412 T3

	acgccgcttc	gcggcgcggc	ttaactcaag	cgttagatgc	actaagcaca	taattgctca	3300
	cagccaaact	atcaggtcaa	gtctgctttt	attattttta	agcgtgcata	ataagcccta	3360
5	cacaaattgg	gagatatatc	atgaaaggct	ggctttttct	tggtatcgca	atagttggcg	3420
	aagtaatcgc	aacatccgca	ttaaaatcta	gcgagggctt	tactaagctc	gtcagcgggt	3480
10	gttggcgggt	gtcggggctg	gcttaactat	gcggcatcag	agcagattgt	actgagagtg	3540
	caccatatgc	ggtgtgaaat	accgcacaga	tgcgtaagga	gaaaataccg	catcaggcgc	3600
	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaaggcgcat	cggtgcgggc	ctcttcgcta	3660
15	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	aacgccaggg	3720
	ttttccagtc	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgaat	tcgagctcgg	taccgccttg	3780
20	ctgcaactct	ctcagggcca	ggcgggtgaag	ggcaatcagc	tggtgcccggt	ctcactgggtg	3840
	aaaagaaaaa	ccaccctggc	gcccaatacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttggccgat	3900
	tcattaatgc	agctggcacg	acaggtttcc	cgactggaaa	gcgggcagtg	agcgcaacgc	3960
25	aattaatgta	agttagcgcg	aattgatctg	gtttgacagc	ttatcatcga	ctgcacgggtg	4020
	caccaatgct	tctggcgta	ggcagccatc	ggaagctgtg	gtatggctgt	gcaggtcgta	4080
30	aatcactgca	taattcgtgt	cgctcaaggc	gcaactcccg	tctggataat	gttttttgcg	4140
	ccgacatcat	aacggttctg	gcaaataattc	tgaaatgagc	tggtgacaat	taatcatccg	4200
	gctcgtataa	tgtgtggaat	tgtgagcgga	taacaatttc	acacaggaaa	gatatcatga	4260
35	gtaaaggaga	agaacttttc	actggagttg	tccaattctt	tggtgaatta	gatggtgatg	4320
	ttaatgggca	caaattttct	gtcagtggag	aggggtgaagg	tgatgcaaca	tacggaaaac	4380
40	ttacccttaa	atttatttgc	actactggaa	aactacctgt	tccatggcca	acacttgtca	4440
	ctactttctc	ttatgggtgt	caatgctttt	cccgttatcc	ggatcatatg	aaacggcatg	4500
45	actttttcaa	gagtgccatg	cccgaagggt	atgtacagga	acgcactata	tctttcaaag	4560
	atgacgggaa	ctacaagacg	cgtgctgaag	tcaagtttga	aggtgatacc	cttggttaatc	4620
	gtatcgagtt	aaaagggtatt	gatttttaaag	aagatggaaa	cattctcgga	cacaaactcg	4680
50	agtacaacta	taactcacac	aatgtataca	tcacggcaga	caaacaaaag	aatggaatca	4740
	aagctaactt	caaaattcgc	cacaacattg	aagatggatc	cgttcaacta	gcagaccatt	4800
55	atcaacaaaa	tactccaatt	ggcgatggcc	ctgtcctttt	accagacaac	cattacctgt	4860
	cgacacaatc	tgccctttcg	aaagatccca	acgaaaagcg	tgaccacatg	gtccttcttg	4920
	agtttgtaac	tgctgctggg	attacacatg	gcatggatga	gctctacaaa	taactgcagg	4980
60	catgcaagct	tggcgtaatc	atggtcatag	ctgtttcctg	tgtgaaattg	ttatccgctc	5040
	acaattccac	acaacatacg	agccggaagc	ataaagtgtg	aagcctgggg	tgccataatga	5100
65							

ES 2 734 412 T3

	gtgagctaac tcacattaat tgcgttgccg tcaactgcccg ctttccagtc gggaaacctg	5160
	tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgaattcc cgacagtaag acgggtaagc	5220
5	ctgttgatga taccgctgcc ttactgggtg cattagccag tctgaatgac ctgtcacggg	5280
	ataatccgaa gtggtcagac tggaaaatca gagggcagga actgctgaac agcaaaaagt	5340
10	cagatagcac cacatagcag acccgccata aaacgccctg agaagcccg gacgggcttt	5400
	tcttgtatta tgggtagttt ccttgcatga atccataaaa ggcgcctgta gtgccattta	5460
	ccccattca ctgccagagc cgtgagcgca gcgaactgaa tgtcacgaaa aagacagcga	5520
15	ctcaggtgcc tgatggctcg agacaaaagg aatattcagc gatttgcccg agcttgcgag	5580
	ggtgctactt aagcctttag ggttttaagg tctgttttgt agaggagcaa acagcgtttg	5640
20	cgacatcctt ttgtaatact gcggaactga ctaaagtagt gagttataca cagggctggg	5700
	atctattctt tttatctttt tttattc	5727
25	<210> 7 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Cebador directo para metA11	
	<400> 7 gagtgcgata tcatgccgat tcgtgtgccg gac	33
35	<210> 8 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Cebador directo para metA11	
	<400> 8 gcactcaagc tttaatcca gcgttgata catg	34
45	<210> 9 <211> 5545 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> pCL_Pcysk-gfp	
55	<400> 9 aactacacg atgctttaac tgcaaaaatt cagctcacca gttttgaggc aaaatTTTTg	60
	agtgacatgc aaagtaagta tgatctcaat ggttcgttct catggctcac gcaaaaacaa	120
60		
65		

ES 2 734 412 T3

	cgaaccacac tagagaacat actggctaaa tacggaagga tctgaggttc ttatggctct	180
	tgtatctatc agtgaagcat caagactaac aaacaaaagt agaacaactg ttcaccgtta	240
5	catatcaaag ggaaaactgt ccatatgcac agatgaaaac ggtgtaaaaa agatagatac	300
	atcagagctt ttacgagttt ttggtgcatt caaagctgtt caccatgaac agatcgacaa	360
10	tgtaacagat gaacagcatg taacacctaa tagaacaggt gaaaccagta aaacaaagca	420
	actagaacat gaaattgaac acctgagaca acttggttaca gctcaacagt cacacataga	480
	cagcctgaaa caggcgatgc tgcttatcga atcaaagctg ccgacaacac gggagccagt	540
15	gacgcctccc gtggggaaaa aatcatggca attctggaag aaatagcgct ttcagccggc	600
	aaaccggctg aagccgatc tgcgattctg ataacaaact agcaacacca gaacagcccg	660
20	tttgcgggca gcaaaacccg tgggaattaa ttcccctgct cgcgcaggct ggggtgccaag	720
	ctctcgggta acatcaaggc ccgatccttg gagcccttg cctcccgac gatgatcgtg	780
	ccgtgatcga aatccagatc cttgaccgc agttgcaaac cctcactgat ccgatgccc	840
25	gttccataca gaagctgggc gaacaaacga tgctcgcctt ccagaaaacc gaggatgcca	900
	accacttcat ccggggtcag caccaccggc aagcgccgcg acggccgagg tcttccgatc	960
30	tcctgaagcc agggcagatc cgtgcacagc accttgccgt agaagaacag caaggccgcc	1020
	aatgcctgac gatgcgtgga gaccgaaacc ttgcgctcgt tcgccagcca ggacagaaat	1080
	gcctcgactt cgctgctgcc caagggtgcc gggtgacgca caccgtggaa acggatgaag	1140
35	gcacgaaccc agtggacata agcctgttcg gttcgtaagc tgtaatgcaa gtagcgtatg	1200
	cgctcacgca actggtccag aaccttgacc gaacgcagcg gtggtaacgg cgcagtggcg	1260
40	gttttcatgg cttgttatga ctgttttttt ggggtacagt ctatgcctcg ggcattccaag	1320
	cagcaagcgc gttacgccgt gggtcgatgt ttgatgttat ggagcagcaa cgatgttacg	1380
45	cagcagggca gtcgccctaa aacaaagtta aacatcatga gggaaagcgt gatcgccgaa	1440
	gtatcgactc aactatcaga ggtagttggc gtcacgagc gccatctcga accgacgttg	1500
	ctggccgtac atttgtacgg ctccgcagtg gatggcggcc tgaagccaca cagtgatatt	1560
50	gatttgctgg ttacgggtgac cgtaaggctt gatgaaacaa cgcggcgagc tttgatcaac	1620
	gaccttttgg aaacttcggc ttcccctgga gagagcgaga ttctccgcgc tgtagaagtc	1680
55	accattgttg tgcacgacga catcattccg tggcggtatc cagctaagcg cgaactgcaa	1740
	tttgggagaat ggcagcgcaa tgacattctt gcaggtatct tcgagccagc cacgatcgac	1800
60	attgatctgg ctatcttgct gacaaaagca agagaacata gcgttgccctt ggtaggtcca	1860
	gcggcgaggg aactctttga tccggttcct gaacaggatc tatttgaggc gctaaatgaa	1920
	accttaacgc tatggaactc gccgcccgc tgggctggcg atgagcgaaa tgtagtgctt	1980
65	acgttgctcc gcatttggtg cagcgagta accggcaaaa tcgcgcccga ggatgtcgct	2040

ES 2 734 412 T3

	gccgactggg caatggagcg cctgccggcc cagtatcagc ccgtcatact tgaagctaga	2100
	caggcttatc ttggacaaga agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa	2160
5	tttgtccact acgtgaaagg cgagatcacc aaggtagtcg gcaaataatg tctaacaatt	2220
	cgttcaagcc gacgccgctt cgcggcgcggt ctttaactcaa gcgttagatg cactaagcac	2280
10	ataattgctc acagccaaac tatcagggtca agtctgcttt tattatTTTT aagcgtgcat	2340
	aataagccct acacaaattg ggagatatat catgaaaggc tggctTTTTt ttgttatcgc	2400
	aatagttggc gaagtaatcg caacatccgc attaaaatct agcgaggggt ttactaagct	2460
15	cgtcagcggg tggtggcggg tgtcgggggt ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg	2520
	tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc	2580
20	gcatcaggcg ccattcgcca ttcagggtgc gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg	2640
	cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg	2700
	taacgccagg gttttccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtga ttcgagctcg	2760
25	gtaccccgac ctgtttacga tgatcccgct gcttaatctg ttcacatgc ccgttgccgt	2820
	ttgtggcgcg acggcgatgt gggtcgattg ctatcgcat aaacacgcga tgtggcggt	2880
30	acaatctacc ggttatTTTT taaaccgttt gtgtgaaaca ggggtggctt atgccgcccc	2940
	ttattccatc ttgcatgtca ttatttcctt tctgtatata gatatgctaa atccttactt	3000
	ccgcatattc tctgagcggg tatgctacct gttgtatccc aatttcatac agttaaggag	3060
35	atatcatgag taaaggagaa gaacttttca ctggagttgt cccaattctt gttgaattag	3120
	atggtgatgt taatgggcac aaattttctg tcagtggaga ggggtgaagg gatgcaacat	3180
40	acggaaaact tacccttaaa tttatttgca ctactggaaa actacctgtt ccattggccaa	3240
	cacttgtcac tactttctct tatgggtgtt aatgcttttc ccgttatccg gatcatatga	3300
45	aacggcatga ctttttcaag agtgccatgc ccgaagggtt tgtacaggaa cgcactatat	3360
	ctttcaaaga tgacgggaac tacaagacgc gtgctgaagt caagtttgaa ggtgataccc	3420
	ttgttaatcg tatcgagtta aaaggattt attttaaaaga agatggaaac attctcggac	3480
50	acaaactcga gtacaactat aactcacaca atgtatacat caggcgagac aaacaaaaga	3540
	atggaatcaa agctaacttc aaaattcgcc acaacattga agatggatcc gttcaactag	3600
55	cagaccatta tcaacaaaat actccaattg gcgatggccc tgtcctttta ccagacaacc	3660
	attacctgtc gacacaatct gccctttcga aagatcccaa cgaaaagcgt gaccacatgg	3720
	tccttcttga gtttgtaact gctgctggga ttacacatgg catggatgag ctctacaaat	3780
60	aactgcaggc atgcaagctt ggcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt	3840
	tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt	3900
65		

ES 2 734 412 T3

	gcctaatagag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg	3960
	ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgaattccc gacagtaaga	4020
5	cgggtaagcc tgttgatgat accgctgcct tactgggtgc attagccagt ctgaatgacc	4080
	tgtcacggga taatccgaag tggtcagact ggaaaatcag agggcaggaa ctgctgaaca	4140
10	gcaaaaagtc agatagcacc acatagcaga cccgccataa aacgccctga gaagcccgtg	4200
	acgggctttt cttgtattat gggtagtttc cttgcatgaa tccataaaaag ggcgctgtag	4260
	tgccattttac ccccatcac tgccagagcc gtgagcgag cgaactgaat gtcacgaaaa	4320
15	agacagcgac tcaggtgcct gatggtcgga gacaaaagga atattcagcg atttgccoga	4380
	gcttgcgagg gtgctactta agcctttagg gttttaaggt ctgttttgta gaggagcaaa	4440
20	cagcgtttgc gacatccttt tgtaatactg cggaactgac taaagtagtg agttatacac	4500
	agggctggga tctattcttt ttatcttttt ttattctttc tttattctat aaattataac	4560
	cacttgaata taaacaaaaa aaacacacaa aggtctagcg gaatttacag agggcttagc	4620
25	agaatttaca agttttccag caaaggtcta gcagaattta cagataccca caactcaaag	4680
	gaaaaggact agtaattatc attgactagc ccatctcaat tggatatagt attaaaatca	4740
30	cctagaccaa ttgagatgta tgtctgaatt agttgttttc aaagcaaagtg aactagcgat	4800
	tagtcgctat gacttaacgg agcatgaaac caagctaatt ttatgctgtg tggcactact	4860
	caaccccacg attgaaaacc ctacaaggaa agaacggacg gtatcgttca cttataacca	4920
35	atacgctcag atgatgaaca tcagtaggga aaatgcttat ggtgtattag ctaaagcaac	4980
	cagagagctg atgacgagaa ctgtggaaat caggaatcct ttggttaaag gctttgagat	5040
40	tttccagtgga acaactatg ccaagttctc aagcgaaaaa ttagaattag tttttagtg	5100
	agagatatgg ccttatcttt tccagttaaa aaaattcata aaatataatc tggaacatgt	5160
45	taagtctttt gaaaacaaat actctatgag gatttatgag tggttattaa aagaactaac	5220
	acaaaagaaa actcacaagg caaatataga gattagcctt gatgaattta agttcatgtt	5280
	aatgcttgaa aataactacc atgagtttaa aaggcttaac caatggggtt tgaaaccaat	5340
50	aagtaaagat ttaaactact acagcaatat gaaattggtg gttgataagc gaggccgccc	5400
	gactgatacg ttgattttcc aagttgaact agatagacaa atggatctcg taaccgaact	5460
55	tgagaacaac cagataaaaa tgaatggtga caaaatacca acaaccatta catcagattc	5520
	ctacctacat aacggactaa gaaaa	5545
60	<210> 10 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Cebador directo para sucAB	

ES 2 734 412 T3

	<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 tcagtaatcg	30	
15	<210> 12		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador directo del casete de delección metB		
	<400> 12		
25	ttactctggg gcctgacatt tcaccgacaa agcccaggga acttcatcac gtgtaggctg	60	
	gagctgcttc	70	
	<210> 13		
30	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
35	<223> Cebador inverso del casete de delección metB		
	<400> 13		
	cgctgcgcca gctccatacg cggcaccagc gttcgcaacc cacgtagcag catatgaata	60	
40	tcctccttag	70	
	<210> 14		
	<211> 20		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo para metB eliminado		
50	<400> 14		
	tattgcgcgc tccattcagc	20	
	<210> 15		
	<211> 20		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo para metB eliminado		
60	<400> 15		
	tacccttgt ttgcagcccg	20	
	<210> 16		
65	<211> 70		
	<212> ADN		

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para el casete de delección thrB	
5	<400> 16	
	catggttaaa gtttatgccc cggcttccag tgccaatatg agcgtcgggt gtgtaggctg	60
	gagctgcttc	70
10	<210> 17	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo para el casete de delección thrB	
	<400> 17	
20	ggagataccg ctcgctaccg cgccgatttc cgcgaccgcc tgccgcgcct catatgaata	60
	tcctccttag	70
	<210> 18	
25	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<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	
45	acgccgagag gatcttcgca g 21	
	<210> 20	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador directo para metA11	
	<400> 20	
55	ggccgaattc atgccgattc gtgtgccgga 30	
	<210> 21	
	<211> 30	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para metA11	
65	<400> 21	

ES 2 734 412 T3

ggccgagttc ttaatccagc gttggattca

30

<210> 22

<211> 933

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1) .. (933)

<223> SucA

<400> 22

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

Asp Pro Asp Ser Val Asp Ala Asn Trp Arg Ser Thr Phe Gln Gln Leu
35 40 45

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

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

ES 2 734 412 T3

					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					
					Ala	Ser	Gly	Lys	Glu	Thr	Met	Lys	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala	Leu
10					145					150					155					
					Lys	Gln	Thr	Tyr	Cys	Gly	Pro	Ile	Gly	Ala	Glu	Tyr	Met	His	Ile	Thr
									165					170						
15					Ser	Thr	Glu	Glu	Lys	Arg	Trp	Ile	Gln	Gln	Arg	Ile	Glu	Ser	Gly	Arg
					180					185					190					
					Ala	Thr	Phe	Asn	Ser	Glu	Glu	Lys	Lys	Arg	Phe	Leu	Ser	Glu	Leu	Thr
20					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	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
30									245					250						
					Gly	Met	Ala	His	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn	Val	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Gly
					260					265					270					
					Lys	Lys	Pro	Gln	Asp	Leu	Phe	Asp	Glu	Phe	Ala	Gly	Lys	His	Lys	Glu
35					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						
					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						
					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

ES 2 734 412 T3

						435																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																</
--	--	--	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

ES 2 734 412 T3

	770	775	780	
5	Pro Leu Ala Val Ser Ser Leu Glu Glu Leu Ala Asn Gly Thr Phe Leu 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			
30	Gly Tyr Met Ser Val His Gln Lys Gln Gln Gln Asp Leu Val Asn Asp 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 gcgctttgaa agcctgggtg gactcttctt acctctctgg cgcaaaccag			
	agctggatag aacagctcta tgaagacttc ttaaccgatc ctgactcggg tgacgctaac			
50	tggcggttcga cgttccagca gttacctggt acgggagtc aaccggatca attccactct			
	caaacgcgtg aatatttccg ccgcctggcg aaagacgctt cacgttactc ttcaacgatc			
55	tccgaccctg acaccaatgt gaagcagggt aaagtcctgc agtcattaa cgcataccgc			
	ttccgtggtc accagcatgc gaatctcgat ccgctgggac tgtggcagca agataaagtg			
	gccgatctgg atccgtcttt ccacgatctg accgaagcag acttccagga gaccttcaac			
60	gtcggttcat ttgccagcgg caaagaaacc atgaaactcg gcgagctgct ggaagccctc			
	aagcaaacct actgcggccc gattggtgcc gagtatatgc acattaccag caccgaagaa			
65				

ES 2 734 412 T3

	aaacgctgga tccaacagcg tatcgagtct ggtcgcgcga ctttcaatag cgaagagaaa	600
	aaacgcttct taagcgaact gaccgccgct gaaggtcttg aacgttacct cggcgcaaaa	660
5	ttccctggcg caaaacgctt ctcgctggaa ggcggtgacg cgtaaataccc gatgcttaaa	720
	gagatgatcc gccacgctgg caacagcggc acccgcgaaag tggttctcgg gatggcgcac	780
10	cgtggctcgtc tgaacgtgct ggtgaacgtg ctgggtaaaa aaccgcaaga cttgttcgac	840
	gagttcgccg gtaaacataa agaacacctc ggcacgggtg acgtgaaata ccacatgggc	900
	ttctcgtctg acttccagac cgatggcggc ctggtgcacc tggcgctggc gtttaacccg	960
15	tctcaccttg agattgtaag cccggtagtt atcggttctg ttcgtgcccg tctggacaga	1020
	cttgatgagc cgagcagcaa caaagtgtg ccaatcacca tccacggtga cgcgcgagt	1080
20	accgggcagg gcgtggttca ggaaaccctg aacatgtcga aagcgcgtgg ttatgaagtt	1140
	ggcgggtacgg tacgtatcgt tatcaacaac caggttggtt tcaccacctc taatccgctg	1200
	gatgcccggt ctacgccgta ctgtactgat atcggttaaga tggttcaggc cccgattttc	1260
25	cacgttaacg cggacgatcc ggaagccgtt gcctttgtga cccgtctggc gctcgatttc	1320
	cgtaacacct ttaaacgtga tgtcttcacg gacctggtgt gctaccgccg tcacggccac	1380
30	aacgaagccg acgagccgag cgcaaccag ccgctgatgt atcagaaaat caaaaaacat	1440
	ccgacaccgc gcaaaatcta cgctgacaag ctggagcagg aaaaagtggc gacgctggaa	1500
35	gatgccaccg agatggttaa cctgtaccgc gatgcgctgg atgctggcga ttgcgtagt	1560
	gcagagtggc gtccgatgaa catgcactct ttcacctggt cgccttacct caaccacgaa	1620
	tgggacgaag agtaccgaa caaagttgag atgaagcgcc tgcaggagct ggcgaaacgc	1680
40	atcagcacgg tgccggaagc agttgaaatg cagtctcgcg ttgccaatat ttatggcgat	1740
	cgccaggcga tggctgccgg tgagaaactg ttcgactggg gcggtgcgga aaacctcgct	1800
45	tacgccacgc tggttgatga aggcattccg gttcgcctgt cgggtgaaga ctccggtcgc	1860
	ggtaccttct tccaccgcca cgcggtgatc cacaaccagt ctaacggttc cacttacacg	1920
	ccgctgcaac atatccataa cgggcagggc gcgttccgtg tctgggactc cgtactgtct	1980
50	gaagaagcag tgctggcggt tgaatatggt tatgccaccg cagaaccacg cactctgacc	2040
	atctgggaag cgcagttcgg tgacttcgcc aacggtgcgc aggtggttat cgaccagttc	2100
55	atctcctctg gcgaacagaa atggggccgg atgtgtggtc tggatgatgt gctgccgcac	2160
	ggttacgaag ggcaggggccc ggagcactcc tccgcgcgtc tggaaagtta tctgcaactt	2220
	tgtgctgagc aaaacatgca ggtttgcgta ccgtctaccc cggcacagggt ttaccacatg	2280
60	ctgcgtcgtc aggcgctgcg cgggatgcgt cgtccgctgg tcgtgatgtc gccgaaatcc	2340
	ctgctgcgtc atccgctggc ggtttccagc ctcgaagaac tggcgaacgg caccttcctg	2400
65	ccagccatcg gtgaaatcga cgagcttgat ccgaagggcg tgaagcgct agtgatgtgt	2460

ES 2 734 412 T3

tctggtaagg tttattacga cctgctggaa cagcgtcgta agaacaatca acacgatgtc 2520
gccattgtgc gtatcgagca actctacccg ttcccgcata aagcgatgca ggaagtgttg 2580
5 cagcagtttg ctcacgtcaa ggattttgtc tgggtgccagg aagagccgct caaccagggc 2640
gcatggtact gcagccagca tcatttccgt gaagtgattc cgtttggggc ttctctgcgt 2700
10 tatgcaggcc gcccggcctc cgcctctccg gcggtagggt atatgtccgt tcaccagaaa 2760
cagcaacaag atctgggtta 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
30 20 25 30
Arg Asp Glu Val Leu Val Glu Ile Glu Thr Asp Lys Val Val Leu Glu
35 35 40 45
Val Pro Ala Ser Ala Asp Gly Ile Leu Asp Ala Val Leu Glu Asp Glu
60 50 55 60
Gly Thr Thr Val Thr Ser Arg Gln Ile Leu Gly Arg Leu Arg Glu Gly
80 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
65 Leu Glu Ala Lys Asn Ser Thr Ala Met Leu Thr Thr Phe Asn Glu Val

ES 2 734 412 T3

		195					200					205					
5		Asn	Met	Lys	Pro	Ile	Met	Asp	Leu	Arg	Lys	Gln	Tyr	Gly	Glu	Ala	Phe
		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											
45						405											
		<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															
		gcaacctggc ataaaaaacc cggcgacgca gtcgtacgtg atgaagtgtt ggtagaaatc															
60		gaaactgaca aagtgggtact ggaagtaccg gcatcagcag acggcattct ggatgcgggtt															
		ctggaagatg aaggtacaac ggtaacgtct cgtcagatcc ttggtgcgct gcgtgaaggc															
		aacagcgccg gtaaagaaac cagcgccaaa tctgaagaga aagcgtccac tccggcgcaa															
65																	

ES 2 734 412 T3

```

cgccagcagg cgtctctgga agagcaaaac aacgatgcgt taagcccggc gatccgtcgc      360
ctgctggctg aacacaatct cgacgccagc gccattaaag gcaccgggtgt ggggtggctcgt      420
5  ctgactcgtg aagatgtgga aaaacatctg gcgaaagccc cggcgaaaga gtctgctccg      480
gcagcgggtg ctccggcggc gcaaccggct ctggctgcac gtagtgaaaa acgtgtcccg      540
10 atgactcgcc tgcgtaagcg tgtggcagag cgtctgctgg aagcgaaaaa ctccaccgcc      600
atgctgacca cgttcaacga agtcaacatg aagccgatta tggatctgcg taagcagtac      660
ggtgaagcgt ttgaaaaacg ccacggcatc cgtctgggct ttatgtcctt ctacgtgaaa      720
15 gcggtgggtt aagccctgaa acgttaccgg gaagtgaacg cttctatcga cggcgatgac      780
gtggtttacc acaactatth cgacgtcagc atggcgggtt ctacgccgcg cggcctggtg      840
20 acgccgggtt tgcgtgatgt cgataccctc ggcatggcag acatcgagaa gaaaatcaaa      900
gagctggcag tcaaaggccg tgacggcaag ctgaccgttg aagatctgac cgggtggtaac      960
ttcaccatca ccaacgggtg tgtgttcggt tccctgatgt ctacgccgat catcaaccgg      1020
25 ccgcagagcg caattctggg tatgcacgct atcaaagatc gtccgatggc ggtgaatggt      1080
caggttgaga tcctgccgat gatgtacctg gcgctgtcct acgatcaccg tctgatcgat      1140
30 ggtcgcgaaat ccgtgggctt cctggtaacg atcaaagagt tgctggaaga tccgacgcgt      1200
ctgctgctgg acgtgtag      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

    Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu
        20              25              30

    Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile
        35              40              45

    Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln
        50              55              60

    Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr
        65              70              75              80

    Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln
        85              90              95

```

65

ES 2 734 412 T3

	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
		130					135					140				
10	Val	Gln	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ile	Pro	Lys	Gln	Thr	Arg
	145					150					155					160
	Thr	Glu	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Tyr	Glu	His	His	Ile	Leu	His	Pro	His
15					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			
	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Tyr	Leu	Phe	Ala	Ser
25		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	
	Pro	Asp	Val	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Phe	Pro	His	Asn	Asp	Pro	Gln	Asn	Thr
35				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				
45	Asn	Pro	Thr	Leu	Asp											
	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 tcttgcggtga agaaaacgtc 60

60 tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc 120

cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac 180

65 tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgcgatt cccgtgaatc ggcgaacacg 240

ES 2 734 412 T3

	ccgcgagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt	300
	gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctgggtg agtttaatga tgcgcttac	360
5	tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt	420
	gtctgctggg cggtagaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc	480
10	accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg	540
	cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg	600
	ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat	660
15	ctgtttgccg gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccgga atatgatgcg	720
	caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg	780
20	tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac	840
	ggtaattttac tgttttaccaa ctgggtcaac 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		

ES 2 734 412 T3

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

ES 2 734 412 T3

	<400> 29	
	atgacgcgta aacaggccac catcgcagtg cgtagcgggt taaatgacga cgaacagtat	60
5	ggttgcgttg tcccaccgat ccatctttcc agcacctata actttaccgg atttaaatgaa	120
	ccgcgcgcgc atgattactc gcgtcgcggc aaccaaacgc gcgatgtggg tcagcgtgcg	180
	ctggcagaac tggaaggtgg tgctggtgca gtacttacta ataccggcat gtccgcgatt	240
10	cacctggtaa cgaccgtctt tttgaaacct ggcgatctgc tggttgcgcc gcacgactgc	300
	tacggcggta gctatcgctt gttcgacagt ctggcgaaac gcggttgcta tcgcgtgttg	360
15	tttgttgatc aaggcgatga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg	420
	gtactggtag aaagcccaag taatccattg ttacgcgtcg tggatattgc gaaaatctgc	480
	catctggcaa ggggaagtcgg ggcggtgagc gtggtggata acaccttctt aagcccggca	540
20	ttacaaaatc cgctggcatt aggtgccgat ctggtgttgc attcatgcac gaaatatctg	600
	aacggctcact cagacgtagt ggccggcgtg gtgattgcta aagaccgga cgttgtcact	660
25	gaactggcct ggtgggcaaa caatattggc gtgacgggcg gcgcgtttga cagctatctg	720
	ctgctacgtg gggtgcgaac gctggtgccg cgtatggagc tggcgcagcg caacgcgcag	780
	gcgattgtga aatacctgca aaccagccg ttggtgaaaa aactgtatca cccgtcgttg	840
30	ccggaaaatc aggggcatga aattgccgcg cgccagcaaa aaggcttttg cgcaatgttg	900
	agttttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcggt tcctgggcgg gctgtcgttg	960
35	tttacgctgg cggaatcatt agggggagtg gaaagtttaa tctctcacgc cgcaaccatg	1020
	acacatgcag gcatggcacc agaagcgcgt gctgccgccg ggatctccga gacgctgctg	1080
40	cgtatctcca ccggtattga agatggcgaa gatttaattg ccgacctgga aaatggcttc	1140
	cgggctgcaa acaaggggta a	1161
	<210> 30	
45	<211> 310	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
	<220>	
50	<221> PÉPTIDO	
	<222> (1) .. (310)	
	<223> ThrB	
	<400> 30	
55	Met Val Lys Val Tyr Ala Pro Ala Ser Ser Ala Asn Met Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	Phe Asp Val Leu Gly Ala Ala Val Thr Pro Val Asp Gly Ala Leu Leu	
60	20 25 30	
	Gly Asp Val Val Thr Val Glu Ala Ala Glu Thr Phe Ser Leu Asn Asn	
	35 40 45	
65	Leu Gly Arg Phe Ala Asp Lys Leu Pro Ser Glu Pro Arg Glu Asn Ile	

ES 2 734 412 T3

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

ES 2 734 412 T3

<400> 31

	atggttaaag tttatgcccc ggcttccagt gccaatatga gcgtcgggtt tgatgtgctc	60
5	ggggcggcgg tgacacctgt tgatggtgca ttgctcggag atgtagtcac gggtgaggcg	120
	gcagagacat tcagtctcaa caacctcgga cgctttgccg ataagctgcc gtcagaacca	180
10	cgggaaaata tcgtttatca gtgctgggag cgtttttgcc aggaactggg taagcaaatt	240
	ccagtggcga tgaccctgga aaagaatatg ccgatcgggtt cgggcttagg ctccagtgcc	300
	tgttcgggtg tgcgcggcgt gatggcgatg aatgaacact gcggcaagcc gcttaatgac	360
15	actcgtttgc tggctttgat gggcgagctg gaaggccgta tctccggcag cattcattac	420
	gacaacgtgg caccgtgttt tctcggtggt atgcagttga tgatcgaaga aaacgacatc	480
20	atcagccagc aagtgccagg gtttgatgag tggctgtggg tgctggcgta tccggggatt	540
	aaagtctcga cggcagaagc cagggctatt ttaccggcgc agtatcgccg ccaggattgc	600
	attgcgcacg ggcgacatct ggcaggcttc attcacgcct gctattcccg tcagcctgag	660
25	cttgccgcga agctgatgaa agatgttatc gctgaaccct accgtgaacg gttactgcca	720
	ggcttccggc aggcgcggca ggcggtcgcg gaaatcggcg cggtagcgag cggtatctcc	780
30	ggctccggcc cgacctgtgt cgctctgtgt gacaagccgg aaaccgcccc gcgcgttgcc	840
	gactgggttg gtaagaacta cctgcaaaat caggaagggt ttgttcatat ttgccggctg	900
35	gatacggcgg gcgcacgagt actggaaaac taa	933

<210> 32

<211> 309

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> MetA11

<400> 32

45	Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg	1 5 10 15
	Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Pro Gly Gln Glu	20 25 30
50	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
	Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr	65 70 75 80
60	Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln	85 90 95
65	Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu	100 105 110

ES 2 734 412 T3

	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	
10						150					155					160	
	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	
20			195					200					205				
	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																
45	<210>	33															
	<211>	930															
	<212>	ADN															
	<213>	Secuencia Artificial															
50	<220>																
	<223>	metA11															
	<400>	33															
	atgccgattc	gtgtgccgga	cgagctaccc	gccgtcaatt	tcttgcggtga	agaaaacgtc											60
55	tttgtgatga	caacttctcg	tgcgcctggt	caggaaattc	gtccacttaa	ggttctgatc											120
	cttaacctga	tgccgaagaa	gattgaaact	gaaaatcagt	ttctgcgccct	gctttcaaac											180
	tcacctttgc	aggtcgatat	tcagctgttg	cgcacgcatt	cccgtgaatc	gcgcaacacg											240
60	cccgagagc	atctgaacaa	cttctactgt	aactttgaag	atattcagga	tcagaacttt											300
	gacggtttga	ttgtaactgg	tgcgccgctg	ggcctgggtg	ggtttaatga	tgtcgcttac											360
65																	

ES 2 734 412 T3

	tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtct	420
	gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc	480
5	accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg	540
	cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg	600
10	ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat	660
	ctgtttgccg gtaaagataa ggcgattgcc tttgtgacgg gccatccga atatgatgcg	720
	caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg	780
15	tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac	840
	ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat	900
20	ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa	930
	<210> 34	
	<211> 15351	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> vector pCC1BAC_srcO	
30	<400> 34	
	cctggcactg ctacgatctg ataagccagc tgatcgaggg cgatacggcc gaaacgctac	60
	aacgctacct gcccgcacag ctgcagtttc ggcatcagta ataactgagt atttttgaat	120
35	agcgacgctg gatgccgatt ggtctgaacg gcccggcgat cgccgggcat accattggcg	180
	ccggcatcgt gctggtaacg accatattag ggcgtttgag cagttgcctg gcctcacgca	240
40	gggagactgg attaaactgac cgctgacaaa atgcctgaca atgacagtcc gttttgtgcc	300
	ggcatgcaag cttgagtatt ctatagtctc acctaaatag cttggcgtaa tcatgggcat	360
	agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa	420
45	gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta attgcgttgc	480
	gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgctcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc	540
50	aacgcgaacc ccttgcggcc gcccgggccc tcgaccaatt ctcatgtttg acagcttata	600
	atcgaatttc tgccattcat ccgcttatta tcaattattc aggcgtagca accaggcggt	660
	taagggcacc aataactgcc ttaaaaaaat tacgccccgc cctgccactc atcgcagtac	720
55	tgttgtaatt cattaagcat tctgccgaca tggaagccat cacaacggc atgatgaacc	780
	tgaatcgcca gcggcatcag caccttgctg ccttgcgat aatatttgcc catggtgaaa	840
60	acgggggcga agaagttgtc catattggcc acgttttaaata caaaactggg gaaactcacc	900
	cagggattgg ctgagacgaa aaacatatct tcaataaacc ctttagggaa ataggccagg	960
65		

ES 2 734 412 T3

	ttttcacCGT aacacGCCac atcttgcGaa tatatgtGta gaaactGCCg gaaatCGtCG	1020
	tggtattCac tccagagCGa tgaaaacGtt tcagtttGct catggaaaac ggtGtaacaa	1080
5	gggtgaacac tatcccatat caccagctca ccgtctttca ttgccatacG aaattccGga	1140
	tgagcattca tcaggCGggc aagaatgtGa ataaaggCCg gataaaaactt gtGcttattt	1200
10	ttctttacGg tcttttaaaaa ggccGtaata tccagctGaa cggTctGggt ataggtacat	1260
	tgagcaactG actgaaatGc ctcaaaaatgt tctttacGat gccattGgga tatatcaacG	1320
	gtGgtatatc cagtGatttt tttctccatt ttagcttcct tagctcctGa aaatctcGat	1380
15	aactcaaaaa atacGcccGg tagtGatctt atttcattat ggtGaaagtt ggaacctctt	1440
	acgtGCCgat caacgtctca ttttcGCCaa aagttGgccc agggcttccc ggtatcaaca	1500
20	gggacaccag gatttatTTa ttctgcGaag tgatcttccG tcacaggtat ttattcGcGa	1560
	taagctcatG gagCGgcGta accgtcGcac aggaaggaca gagaaagCGc ggatctGgga	1620
	agtGacggac agaacGgtca ggacctggat tggggagGcg gttGCCGcg ctGctGctGa	1680
25	cggTgtGacg ttctctGttc cggTcacacc acatacGttc cGCCattcct atGcgatGca	1740
	catGctGtat gccGgtatac cGctGaaagT tctGcaaagc ctGatggGac ataagTccat	1800
30	cagttcaacG gaagtctaca cgaaggtttt tGcGctggat gtGgctGccc ggcaccGggt	1860
	GcagtttGcg atGCCggagT ctGatGcGgt tGcGatGctG aaacaattat cctGagaata	1920
35	aatGccttGg ccttttatatG gaaatgtGga actGagtgGa tatGctGttt ttgtctGtta	1980
	aacagagaag ctGgctGtta tccactGaga agcGaacGaa acagtcGgga aaatctccca	2040
	ttatcGtaga gatccGcatt attaattctca ggagcctGtg tagcGtttat aggaagtagt	2100
40	gttctGtcat gatGcctGca agcGgtaacG aaaacGattt gaatatGcct tcaggaacaa	2160
	tagaaatctt cgtGcGgtgt tacgttGaag tggagcGgat tatGtcagca atggacagaa	2220
45	caacctaatG aacacagaac catgatgtGg tctGtccttt tacagccagT agtGctcGcc	2280
	GcagtcGagc gacagggcGa agccctcGag ctGggtGccc tcGCCgctGg gctggcGgcc	2340
50	gtctatggcc ctGcaaacGc gccagaaacG ccgtcGaagc cgtgtGcGag acaccGcgGc	2400
	cggccGccGg cgttGtgGat acctcGcGga aaacttGgcc ctcactGaca gatgagggGc	2460
	ggacgttgac acttgagggg ccgactcacc cggcGcgGcg ttGacagatG aggggcagGc	2520
55	tcgatttcGg ccggcGacgt ggagctGgcc agcctcGcaa atcggcGaaa acgctGatt	2580
	ttacGcgagT ttccacaga tgatgtGgac aagcctgggg ataagtGccc tGcGgtattG	2640
60	acacttgagG ggcGcgacta ctGacagatG aggggcGcGa tccttgacac ttgagggGca	2700
	gagtgctGac agatgagggg cGcacctatt gacatttgag gggctgtcca caggcagaaa	2760
	atccagcatt tgcaagggtt tccGcccGtt tttcGgccac cGctaacctG tcttttaacc	2820
65	tGcttttaaa ccaatatTTa taaacctgtT ttttaaccag ggctGcGccc tgtGcGcgtG	2880

ES 2 734 412 T3

	accgcgcacg ccgaaggggg gtgccccccc ttctcgaacc ctcccgggctg agtgagcgag	2940
	gaagcaccag ggaacagcac ttatatattc tgcttacaca cgatgcctga aaaaacttcc	3000
5	cttgggggta tccacttatc cacggggata tttttataat tatttttttt atagttttta	3060
	gatcttcttt tttagagcgc cttgtaggcc tttatccatg ctggttctag agaagggtgtt	3120
10	gtgacaaaatt gccctttcag tgtgacaaat caccctcaaa tgacagtcct gtctgtgaca	3180
	aattgccctt aaccctgtga caaattgccc tcagaagaag ctgttttttc acaaagttat	3240
	ccctgcttat tgactctttt ttatttagtg tgacaatcta aaaacttgtc acacttcaca	3300
15	tggatctgtc atggcggaag cagcggttat caatcacaag aaacgtaaaa atagcccgcg	3360
	aatcgtccag tcaaacgacc tcactgaggc ggcatatagt ctctcccggg atcaaaaacg	3420
20	tatgctgtat ctgttcgttg accagatcag aaaatctgat ggcaccctac aggaacatga	3480
	cggatctgtc gagatccatg ttgctaaata tgctgaaata ttccggattga cctctgcgga	3540
	agccagtaag gatatacggc aggcattgaa gagtttcgcg gggaaggaag tggtttttta	3600
25	tcgccctgaa gaggatgccg gcgatgaaaa aggctatgaa tcttttcctt ggtttatcaa	3660
	acgtgcgcac agtccatcca gagggcttta cagtgtacat atcaacccat atctcattcc	3720
30	cttctttatc gggttacaga accggtttac gcagtttcggt cttagtgaag caaaagaaat	3780
	caccaatccg tatgccatgc gtttatacga atccctgtgt cagtatcgta agccggatgg	3840
35	ctcaggcatc gtctctctga aaatcgactg gatcatagag cgttaccagc tgccctcaag	3900
	ttaccagcgt atgcctgact tccgccgccg cttcctgcag gtctgtgtta atgagatcaa	3960
	cagcagaact ccaatgcgcc tctcatatcat tgagaaaaag aaaggccgcc agacgactca	4020
40	tatcgtatctt tccttccgcg atatcacttc catgacgaca ggatagtctg agggttatct	4080
	gtcacagatt tgagggtggt tcgtcacatt tgttctgacc tactgagggt aatttgtcac	4140
45	agttttgctg tttccttcag cctgcattga ttttctcata ctttttgaac tgtaattttt	4200
	aaggaagcca aatttgaggg cagtttgtca cagttgattt ccttctcttt cccttcgtca	4260
50	tgtgacctga tatcgggggt tagttcgtca tcattgatga gggttgatta tcacagttta	4320
	ttactctgaa ttggctatcc gcgtgtgtac ctctacctgg agtttttccc acgggtggata	4380
	tttcttcttg cgctgagcgt aagagctatc tgacagaaca gttcttcttt gcttcctcgc	4440
55	cagttcgctc gctatgctcg gttacacggc tgccggcgagc gctagtata ataagtgact	4500
	gaggtatgtg ctcttcttat ctctttttgt agtggtgctc ttatttttaa caactttgcg	4560
60	gttttttgat gactttgcga ttttgttgtt gctttgcagt aaattgcaag atttaataaa	4620
	aaaacgcaaa gcaatgatta aaggatgttc agaataaaac tcatggaaac acttaaccag	4680
65	tgcataaacg ctggtcatga aatgacgaag gctatcgcca ttgcacagtt taatgatgac	4740

ES 2 734 412 T3

	agcccggaag	cgaggaaaaat	aacccggcgc	tggagaatag	gtgaagcagc	ggatttagtt	4800
	ggggtttctt	ctcaggctat	cagagatgcc	gagaaagcag	ggcgactacc	gcacccggat	4860
5	atggaaattc	gaggacgggt	tgagcaacgt	gttggttata	caattgaaca	aattaatcat	4920
	atgcgtgatg	tgtttgttac	gcgattgcga	cgtgctgaag	acgtatttcc	accggtgatc	4980
10	ggggttgctg	cccataaagg	tggcgtttac	aaaacctcag	tttctgttca	tcttgctcag	5040
	gatctggctc	tgaaggggct	acgtgttttg	ctcgtggaag	gtaacgaccc	ccagggaaca	5100
	gcctcaatgt	atcacggatg	ggtaccagat	cttcatattc	atgcagaaga	cactctcctg	5160
15	cctttctatc	ttggggaaaa	ggacgatgtc	acttatgcaa	taaagcccac	ttgctggccg	5220
	gggcttgaca	ttattccttc	ctgtctggct	ctgcaccgta	ttgaaactga	gttaatgggc	5280
20	aaatttgatg	aaggtaaact	gccacccgat	ccacacctga	tgctccgact	ggccattgaa	5340
	actgttgctc	atgactatga	tgtcatagtt	attgacagcg	cgcctaacct	gggtatcggc	5400
	acgattaatg	tcgtatgtgc	tgctgatgtg	ctgattgttc	ccacgcctgc	tgagttgttt	5460
25	gactacacct	ccgcactgca	gtttttcgat	atgcttcgtg	atctgctcaa	gaacgttgat	5520
	cttaaagggg	tcgagcctga	tgtacgtatt	ttgcttacca	aatacagcaa	tagcaatggc	5580
30	tctcagtcct	cgtggatgga	ggagcaaatt	cgggatgcct	ggggaagcat	ggttctaaaa	5640
	aatgttgtag	gtgaaacgga	tgaagtgggt	aaaggtcaga	tccggatgag	aactgttttt	5700
35	gaacaggcca	ttgatcaacg	ctcttcaact	ggtgcctgga	gaaatgctct	ttctatttgg	5760
	gaacctgtct	gcaatgaaat	tttcgatcgt	ctgattaaac	cacgctggga	gattagataa	5820
	tgaagcgtgc	gcctgttatt	ccaaaacata	cgctcaatac	tcaaccgggt	gaagatactt	5880
40	cgttatcgac	accagctgcc	ccgatgggtg	attcgttaat	tgcgcgcgta	ggagtaatgg	5940
	ctcgcggtaa	tgccattact	ttgcctgtat	gtggtcggga	tgtgaagttt	actcttgaag	6000
45	tgctccgggg	tgatagtgtt	gagaagacct	ctcgggtatg	gtcaggtaat	gaacgtgacc	6060
	aggagctgct	tactgaggac	gcactggatg	atctcatccc	ttcttttcta	ctgactggtc	6120
50	aacagacacc	ggcgttcggt	cgaagagtat	ctgggtgtcat	agaaattgcc	gatgggagtc	6180
	gccgtcgtaa	agctgctgca	cttaccgaaa	gtgattatcg	tgttctgggt	ggcgagctgg	6240
	atgatgagca	gatggctgca	ttatccagat	tgggtaacga	ttatcgccca	acaagtgctt	6300
55	atgaacgtgg	tcagcgttat	gcaagccgat	tgcagaatga	atttgctgga	aatatttctg	6360
	cgctggctga	tgcggaaaaat	atttcacgta	agattattac	ccgctgtatc	aacaccgcca	6420
60	aattgcctaa	atcagttgtt	gctctttttt	ctcaccocgg	tgaactatct	gcccgggtcag	6480
	gtgatgcact	tcaaaaagcc	tttacagata	aagaggaatt	acttaagcag	caggcatcta	6540
	accttcatga	gcagaaaaaa	gctgggggtga	tatttgaagc	tgaagaagtt	atcactcttt	6600
65	taacttctgt	gcttaaaaacg	tcactctgcat	caagaactag	tttaagctca	cgacatcagt	6660

ES 2 734 412 T3

	ttgctcctgg agcgacagta ttgtataagg gcgataaaat ggtgcttaac ctggacaggt	6720
	ctcgtgttcc aactgagtgt atagagaaaa ttgaggccat tcttaaggaa cttgaaaagc	6780
5	cagcaccctg atgcgaccac gtttttagtct acgtttatct gtctttactt aatgtccttt	6840
	gttacaggcc agaaagcata actggcctga atattctctc tgggcccact gttccacttg	6900
10	tatcgtcgtt ctgataatca gactgggacc acgggtcccac tcgtatcgtc ggtctgatta	6960
	ttagtctggg accacggtcc cactcgtatc gtcggtctga ttattagtct gggaccacgg	7020
	tcccactcgt atcgtcgttc tgataatcag actgggacca cgggtcccact cgtatcgtcg	7080
15	gtctgattat tagtctggga ccatgggtccc actcgtatcg tcggtctgat tattagtctg	7140
	ggaccacggt cccactcgtc tcgtcgtctc gattattagt ctggaaccac ggtcccactc	7200
20	gtatcgtcgg tctgattatt agtctgggac cacgggtccca ctcgtatcgt cggctctgatt	7260
	attagtctgg gaccacgatc ccactcgtgt tgtcgggtctg attatcggtc tgggaccacg	7320
	gtcccacttg tattgtcgat cagactatca gcgtgagact acgattccat caatgcctgt	7380
25	caagggcaag tattgacatg tcgtcgtaac ctgtagaacg gagtaacctc ggtgtgcggt	7440
	tgtatgcctg ctgtggattg ctgctgtgtc ctgcttatcc acaacatttt gcgcacgggt	7500
30	atgtggacaa aatacctggt taccagggc gtgccggcac gttaaccggg ctgcatccga	7560
	tgcaagtgtg tcgctgtcga cgagctcgcg agctcggaca tgagggttgcc ccgtattcag	7620
35	tgtcgtgat ttgtattgtc tgaagtgtt tttacgttaa gttgatgcag atcaattaat	7680
	acgatacctg cgtcataatt gattatttga cgtgggttga tggcctccac gcacgttgtg	7740
	atatgtagat gataatcatt atcactttac gggtcctttc cgggtgatccg acaggttacg	7800
40	gggcggcgac ctcgcgggtt ttcgctattt atgaaaattt tccggtttta ggcgtttccg	7860
	ttcttcttcg tcataactta atgtttttat ttaaaatacc ctctgaaaag aaaggaaacg	7920
45	acagggtgctg aaagcgagct ttttggcctc tgtcgtttcc tttctctgtt tttgtccgtg	7980
	gaatgaacaa tggaagtccg agctcatcgc taataacttc gtatagcata cattatacga	8040
50	agttatattc gatgcggccg caaggggttc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc	8100
	tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa	8160
	ataccacaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacagggc gccattcgcc attcagctgc	8220
55	gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaaag	8280
	ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt	8340
60	gtaaaacgac ggccagtga ttgtaatacg actcactata gggcgaattc gagctcggta	8400
	cccggggatc ctctagagtc gacctgcagg catgcaagct tattcaggct gcgcaactgt	8460
65	tgggaagggc gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt	8520

ES 2 734 412 T3

	gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcc a gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg	8580
	acggccagtg aattcgagct cggtaacccg ggatcctcta gaggaattca tccgccagtt	8640
5	catccgggaa cggctctggc aggcagtgcc cgcagtcata catgaccgac ctgataacgt	8700
	ctggccttct tcgctcagta acgttttggtg tccaggacgt cagtcttcac agctgtcaaa	8760
10	tcaacgctat ttcataaggc ggctcacgtt tttatgtcat gagccgcgct tttccggctg	8820
	gaacgttcca cccactcggc cactgtgatt taatatgcta aaccggttta attaaagttta	8880
	gctttggagg gtttttagcat gaatgcaaaa gtttggttgc tgggcgacgc ggtggtggac	8940
15	ctgctgcccg agagcgaagg gcgcctgctg cagtgccttg gaggcgcgcc ggctaacgtg	9000
	gcggtagggg ttgccgcct tggcggcaac agcggattta tcggccgcgt cggcgggtgac	9060
20	ccgtttggcc gctacatgcg tcataccctg caacaggagc aggtcgacgt cagccatatg	9120
	tatctcgacg atcagcaccg cacgtccact gtggtcgtcg accttgacga ccagggggaa	9180
	cgcaccttta cctttatggt acgccccagc gcggacctgt tcctggttga agaagacctg	9240
25	ccacagtttg ccgccggaca gtggttgac gtctgctcca tcgcgctcag cgcgagccc	9300
	agccgtagca ctaccttcgc ggcgatggag agcatcaggt ctgccggcgg tcgggtcagc	9360
30	tttgacccta atattcgtcc cgatctctgg caggatcagg ctttgctgct agcctgcctc	9420
	gatcgcgctt tgcacatggc caacgcggta aagctatcgg aagaggagct ggtcttcac	9480
35	agcagcagta atgatttagc atacggaatc gccagcgtaa cggagcgcta tcagccagaa	9540
	ttgctactgg tgaccggggg caaagcgggg gtgcttgccg cgtttcagca gaagtttacc	9600
	catttcaacg cccggcctgt ggccagcgtg gacaccaccg gcgcgggaga cgcatttgctc	9660
40	gccggactgc tcgccagcct tgcggctaac gggatgccaa cggacatgac cgcactggaa	9720
	ccgacactca cgcttgacaca gacctgcggc gccctggcca ccacagccaa aggtgcgatg	9780
45	accgccttgc cttatcagcg cgatctcaac cgtcagtttt aatccttaaa gccgctttgc	9840
	gcggctcact ttgttgcatg catcacattt attaaaccgg tttagcatat ttgttttaag	9900
50	aaaaacaaag gtcgggctta gcatagcgcc taaaccgggt tagcaaaaat tataattttc	9960
	catttttact tttgggatgc caacagcatg tacagaaaaa gcacacttgc gatgcttatc	10020
	gctttgctaa ccagcgctgc ctacagccat gcgcaaacgg atataagcac cattgaagcc	10080
55	cgactcaacg cgctggaaaa acgcctgcag gaggcagaaa acagggcgca aacggcgga	10140
	aaccgcgccg gggcggcgga gaaaaaagtt cagcaactca ccgcgcagca gcaaaaaaac	10200
60	cagaactcga ctcaggaagt ggctcagcgt accgccagac ttgagaaaaa agccgatgac	10260
	aaaagcggat ttgagtttca cggttacgcc cgctccggcg tgataatgaa tgattccggc	10320
	gccagcacca aatccggagc ctacataacg ccggcaggtg aaaccggcgg agctatcggc	10380
65	cgtctgggaa accaggccga tacctatggt gaaatgaatc ttgaacataa gcagaccctg	10440

ES 2 734 412 T3

	gataatgggg ccacgacccg ctttaaggtg atggtcgccg acgggcaaac ctcttataac	10500
	gactggactg caagcattag cgatctgaac gttcgtcagg cctttgtcga attgggtaac	10560
5	ctgccgacgt tcgctgggccc atttaagggc tccaccctgt gggccgggaa acgtttcgac	10620
	cgcgacaatt tcgatattca ctggattgac tctgatgtcg tgttcctcgc cggtagccgt	10680
10	ggtggtatct atgacgtgaa gtggaacgac ggcctgcgga gtaatttctc cctgtacggg	10740
	cgtaacttcg gcgacattga tgattccagc aacagcgtgc agaactatat cctcaccatg	10800
	aatcacttcg caggtccgct gcagatgatg gtcagcggtc tgcggtctgc gggcgaagga	10860
15	taacgacgag cgtaaagata gcaacggcaa tctggtaaaa ggcgatgcgg caaacaccgg	10920
	cgtgcatgcg ctgctcggcc tgcataacga cagtttctac ggcctgcgcg acggtagcag	10980
20	taaaaccgct ctgctttatg gtcattggtct gggcgacagag gttaaaggta tcggatctga	11040
	tggcgcaactt cgtccgggag ccgacacatg gcgcattgcc agttacggca ccacgccgct	11100
	cagcgaaaac tggtctgttg ccccggaat gctggcgcaa cgcagtaaag accgctatgc	11160
25	cgatggcgac agctatcagt gggcaacatt caacctgcgt ctgattcagg caatcaatca	11220
	gaatttcgct ctgcctacg gaggcagcta ccagtacatg gatcttaaac ccgaaggtta	11280
30	taacgatcgt caggcgggta acggtagctt ctacaagctc accttcgccc cgacatttaa	11340
	ggtcggcagt attggtgatt tcttcagtcg cccggagatt cgtttctata cctcctggat	11400
35	ggactggagc aaaaaactga ataattacgc cagcgacgac gccctgggca gtgacggttt	11460
	taactcgggc ggcgaatggt ctttcgggtg gcagatggaa acctgggtct gacggcttac	11520
	gcctgatgac aggaatagcc gggggtcaga gcatctttgt cccccggac tcaactaaga	11580
40	cgcagaaaaa gcgctcccgt gaacgcggga cgacaacata aaaatgttta agccttaaga	11640
	gggtactatg gattttgaac agatttcctg ctgcgtgctt ccgcttcttg gaggcaaaga	11700
45	aaatatcgcc agcgccgcgc actgcgccac gcgcctgcgc ctggtgctgg tcgatgattc	11760
	gctggccgac cagcaggcca tcggcaaatg tgaaggggtg aagggtctgtt ttcgtaatgc	11820
50	cggacagatg cagattatct tcggcaccgg ggtggtaaat aagggtctacg ctgcctttac	11880
	tcaggcggcg ggtattagcg aatccagcaa atcgggaagcc gccgacattg cggcaaaaaa	11940
	gctcaatccg ttccagcgca tcgcccgcct gctatcaaac atcttcgtgc cgataatccc	12000
55	tgccatcgtc gcctctggtc tgctgatggg cctgctggga atggtcaaaa catagcgctg	12060
	ggttgacccg ggcaacgcca tctacatcat gctggatatg tgcagctcgg cggcatttat	12120
60	cattctgccg attctgattg gctttaccgc cggccgcgaa ttcggcggta atccttatct	12180
	cggcgcgacg cttggcggca ttctgactca tccagcgtg actaacgcct ggggcgtggc	12240
65	cgcgggtttc cacaccatga actttttcgg cttcgaaatt gccatgatcg gctatcaggg	12300

ES 2 734 412 T3

	tacggtgttc	ccggtactgc	tggcagtatg	gtttatgagc	atcgttgaga	agcagttgcg	12360
	tcgcgcaatc	cccgatgccc	tggattttgat	cctgacgccc	ttcctgacgg	tgattatatc	12420
5	cggttttatc	gccctgttga	ttatcgcccc	ggccgggtcg	gcactgggcg	acggtatctc	12480
	gtttgtcctc	agcaccctga	ttagccacgc	cggctggctc	gccgggttac	tgtttggcgg	12540
10	tctctattca	gttatcgta	ttaccggtat	tcatcacagc	ttccatgcgg	ttgaagccgg	12600
	gttgctgggc	aatccctcca	tcggcgtaaa	cttcctgctg	ccgatttggg	cgatggccaa	12660
	cgtcgctcag	ggcggagcct	gtctggcggt	gtggttcaaa	accaaagatg	caaaaattaa	12720
15	agccattact	ctgccctcgg	cgttttccgc	catgctgggc	atcaccgagg	cggcgatttt	12780
	tggtattaac	ctgcgctttg	tgaagccatt	tattgcggcg	ctgattgggt	gtgcggcggg	12840
20	cggcgcatgg	gtggtatctg	tacacgtcta	catgaccgcg	gtcggcttga	cagcgatccc	12900
	cggcatggcc	atcgtcaggg	ccagttcgct	gttgaactac	attatcggga	tggttatcgc	12960
25	ctttggcgtc	gcctttacgg	tctccctggt	tttgaaatac	aaaacggacg	ctgaataatg	13020
	tctcttccat	cacgactgcc	tgcgattttg	caggccgtaa	tgcagggcca	gccgcgcgcg	13080
	ctggccgata	gccactatcc	gcgctggcac	catgcgccgg	tcaccgggct	gatgaacgac	13140
30	cccaacggct	ttatcgaatt	tgccggacgc	tatcatctgt	tttatcagtg	gaacccgctc	13200
	gcctgcgatc	atacgtttaa	gtgctgggcg	cactggagtt	ccatcgatct	gctgcactgg	13260
35	cagcatgagc	ccattgcgct	gatgccggac	gaagagtatg	accgtaacgg	ctgctactcc	13320
	ggcagcgcg	tggataacaa	cggtagcgtt	accctgtgct	ataccggcaa	cgtgaagttt	13380
40	gccgagggag	ggcgaaccgc	ctggcaatgc	ctggcaacgg	aaaacgctga	cggcaccttc	13440
	cgcaaaatcg	gtccggtcct	gccgctgccg	gagggctaca	ccggccacgt	gcgcgaccca	13500
	aaagtctggc	gacacgaaga	cctgtggtac	atggtgctgg	gcgcgcaggg	tcggcaaaag	13560
45	cgcggcaagg	tgctgctgtt	cagctctcgc	gatctccatc	agtggacgag	tatgggtgaa	13620
	atcgccggcc	acggcatcaa	tggcctcgac	gacgtcggct	atatgtggga	gtgcccggat	13680
50	ctttttccac	tcggcgacca	gcatattcta	acctgctgtc	cgcaggggat	tgcccgtgag	13740
	gaagagtgtc	acctgaacac	ctacccggca	gtatggatgg	cgggcgagtt	tgattacgct	13800
	gctggcgctt	tcagacacgg	cgaactgcac	gaactggacg	ccgggtttga	gttctacgcc	13860
55	ccgcaaacca	tgcttaccag	tgatggccgt	cgtctgctgg	tcggctggat	gggcgtgccg	13920
	gagggcgaag	agatgcttca	gccgaccctg	aacaacggct	ggatccatca	gatgacctgc	13980
60	ctgcgtgagc	tggagtttat	caacggtcag	ctctatcagc	gtccgctacg	ggaactgagc	14040
	gccctgcgcg	gtgaagcgaa	cggctggctg	gggaacgccc	tgccgctggc	gccgatggaa	14100
	atcgatttgc	aaacccgcgg	ggcgatatg	ttgagcctcg	atthttggcg	cgtattaacc	14160
65	cttgagtgcg	atgccagcgg	actccgcctg	gcccgcacga	gtctcgccag	tgacgagatg	14220

ES 2 734 412 T3

	cattatcgtt actggcgcg aaacgtccgc tcgctgcgtg ttttcatcga ccagtcgagc	14280
	gtggagattt tcataaacgg cggatgaagg gtgatgagca gccgctactt cccggcctgc	14340
5	tccggtcagc taacattctc cggcatcacg ccggacgcat tctgctactg gccgctgcga	14400
	acttgcattg tagaataagc gttttgcttc aggcctcatg cgtcgtaatg aaaaccaaac	14460
10	gcgtaaccat taaagatata gccgaacagg ctggcgtctc caaagcgacc gccagcttgg	14520
	tactgaatgg tcgtggcaag gagctgcgcg tggcgcagga aacgcgtgag cgcgtactgt	14580
	cgattgcccg taagcatcac tatcagccaa gcattcatgc ccgctcgtg cgcaacaacc	14640
15	gcagccacac catcgggctg gtggtgccgg agatcaccaa ccacggcttt gcggtctttg	14700
	cccatgagct ggagatgctg tgccgcgagg cgggcgtcca gctgttgatc tcttgactg	14760
20	atgaaaacc cggtcaggag agcgtggtgg tcaataatat gattgcccg caggtcgacg	14820
	ggatgatcgt cgcttcctgt atgcacaacg atgccgacta tctcaaattc agccaacagc	14880
	tgccagtggg gctgtttgac cgggtgcccc atgaaagcgc gctgccgctg gtaatgaccg	14940
25	attcgattac cccaacggcg gaactgattt cccgcatcgc gcctcagcat agcgatgagt	15000
	tctggttttt aggcggtcag gcgcgtctgt cgccctcccg cgatcgtctg accgggttca	15060
30	cgcagggttt ggctcaggcg ggtattgcc tgcgcccgga atgggtgatc aacggcaatt	15120
	accaccccag ctccggctat gagatgtttg ccgcactctg cgcgcgcctt gggcggccgc	15180
35	ctaaggcgct attcaccgcc gcctgcgggc tgctcgaagg ggttctgcgc tatatgagcc	15240
	agcaccattt actcgattcc gatattcatc tgacgagctt tgacgatcac tatctttatg	15300
40	attcgctgtc gctgcgtatc gacactgtcc agcaggataa tcgccagctg g	15351
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.
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.
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.
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. El microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.
6. Un procedimiento de producción de O-succinilhomoserina o ácido succínico, que comprende:
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.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.

FIG. 1

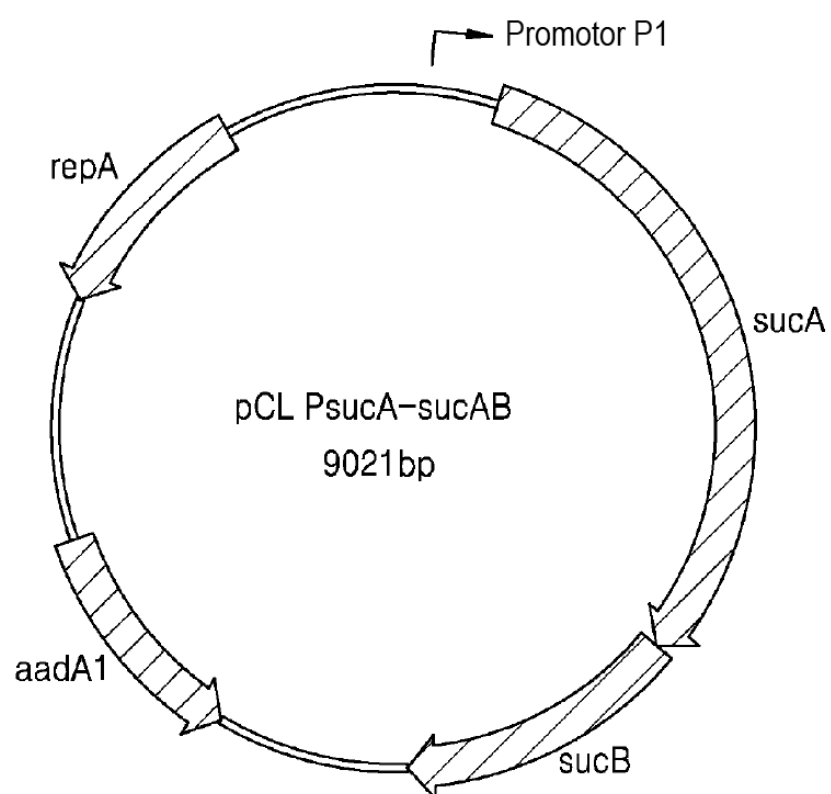


FIG. 2

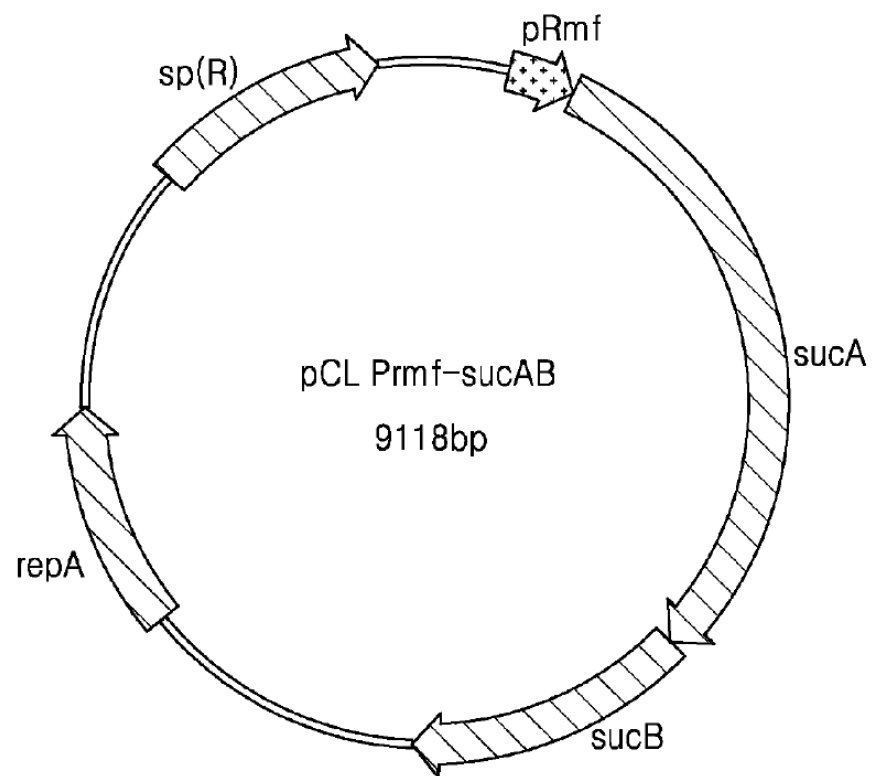


FIG. 3

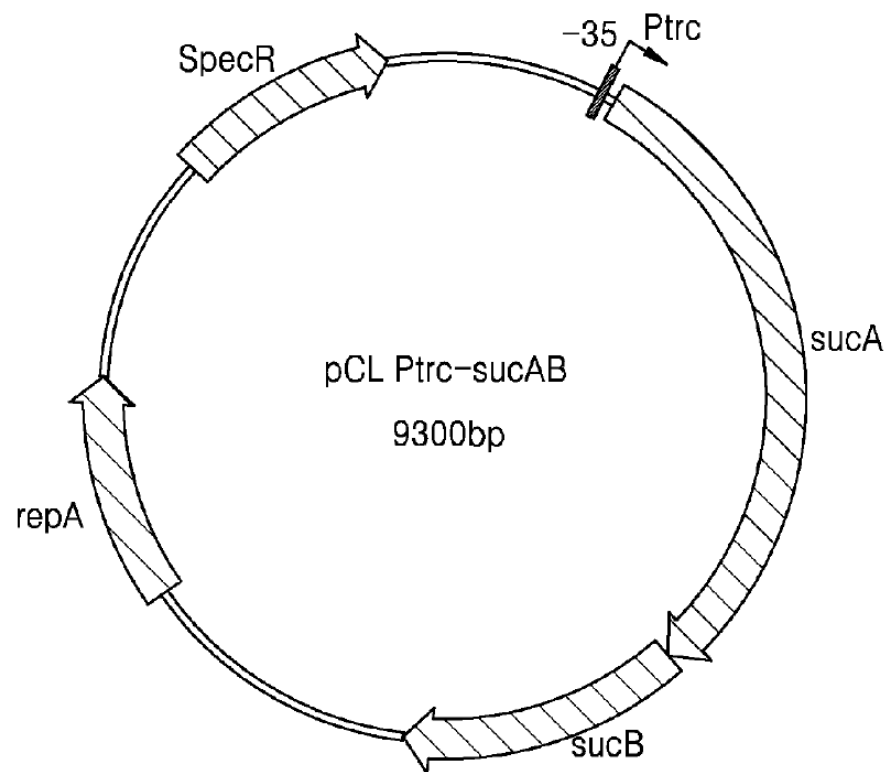


FIG. 4

