

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 529**

51 Int. Cl.:

C12P 13/08 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009** E 16165937 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** EP 3081649

54 Título: **Microorganismo productor de precursor de L-metionina y el procedimiento de producción del precursor de L-metionina usando el microorganismo**

30 Prioridad:

04.04.2008 US 62927

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

02.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHIN, YOUNG UK;
KIM, SO YOUNG;
CHANG, JIN SOOK;
CHO, YOUNG WOOK;
LEE, HAN JIN;
HEO, IN KYUNG;
NA, KWANG HO;
SEO, CHANG IL;
KIM, CHUL HA y
UM, HYE WON**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 736 529 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 productor de precursor de L-metionina y el procedimiento de producción del precursor de L-metionina usando el microorganismo

Antecedentes

5 La metionina es uno de los aminoácidos esenciales del cuerpo humano que se ha usado ampliamente como aditivos de piensos y alimentos y se ha usado además como material de partida sintético para soluciones médicas y suministros médicos. La metionina actúa como un precursor de compuestos tales como colina (lecitina) y creatina y, al mismo tiempo, se usa como materia prima de síntesis para cisteína y taurina. La metionina también puede proporcionar azufre. La S-adenosil-metionina se deriva de L-metionina y desempeña un determinado papel en proporcionar grupo metilo en el cuerpo humano y también está implicada en la síntesis de diversos neurotransmisores en el cerebro. La metionina y/o S-adenosil-L-metionina (SAM) inhiben la acumulación de grasa en el hígado y las arterias y alivian la depresión, inflamación, hepatopatía y dolor muscular, etc.

Las funciones *in vivo* de la metionina y/o S-adenosil-L-metionina conocidas hasta la fecha son como sigue.

15 1) Inhibe la acumulación de grasa en el hígado y las arterias promoviendo el metabolismo lipídico y mejora la circulación sanguínea en el cerebro, corazón y riñón (J Hepatol. Jeon BR *et al.*, 2001 Mar; 34(3): 395-401).

2) Promueve la digestión, desintoxicación y excreción de sustancias tóxicas y la excreción de metales pesados tales como Pb.

3) Se puede administrar como un agente contra la depresión en una dosificación de 800 a 1.600 mg/día (Am J Clin Nutr. Mischoulon D. *et al.*, noviembre de 2002; 76(5): 1158S-61S).

20 4) Potencia las funciones hepáticas (FASEB J. Mato JM., enero de 2002; 16(1): 15-26) y es en particular eficaz en la enfermedad hepática causada por el alcohol (Base de datos Cochrane Syst Rev., Rambaldi A., 2001; (4): CD002235).

25 5) Tiene efecto antiinflamatorio en enfermedades óseas y articulares y promueve la recuperación de las articulaciones (ACP J Club. Sander O., enero-febrero de 2003; 138(1): 21, J Fam Pract., Soeken KL *et al.*, mayo de 2002; 51(5): 425-30).

6) Es un nutriente esencial para el cabello. Proporciona nutrición al cabello y, de este modo, previene la alopecia (Audiol Neurootol., Lockwood DS *et al.*, septiembre-octubre 2000; 5(5): 263-266).

La metionina se puede sintetizar química o biológicamente para aplicarse a piensos, alimentos y medicamentos.

30 En la síntesis química, la metionina se produce principalmente por hidrólisis de 5-(β-metilmercaptoetil)-hidantoína. La metionina sintetizada químicamente tiene la desventaja de que solo se produce como una forma mixta de tipo L y tipo D.

35 En la síntesis biológica, la metionina se produce mediante el procedimiento de uso de proteínas implicadas en la síntesis de metionina. La L-metionina se biosintetiza a partir de homoserina por la acción de la enzima expresada por genes tales como metA, metB, metC, metE y metH en *Escherichia coli*. En particular, metA es el gen que codifica la homoserina O-succiniltransferasa, que es la primera enzima necesaria para la biosíntesis de la metionina, y convierte la homoserina en O-succinil-L-homoserina. La O-succinilhomoserina liasa o cistationina gamma sintasa codificada por el gen metB convierte la O-succinil-L-homoserina en cistationina. La cistationina beta liasa codificada por el gen metC convierte la cistationina en L-homocisteína. MetE codifica la metionina sintasa independiente de cobalamina y metH codifica la metionina sintasa dependiente de cobalamina, convirtiendo ambas la L-homocisteína en L-metionina. En este momento, la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa codificada por metF y la serina hidroximetiltransferasa codificada por glyA funcionan en conjunto para sintetizar N(5)-metiltetrahidrofolato que proporciona el grupo metilo necesario para la síntesis de L-metionina.

45 La L-metionina se sintetiza mediante una serie de reacciones orgánicas por las enzimas anteriores. La modificación genética en las proteínas anteriores u otras proteínas que afectan a las proteínas anteriores podría dar como resultado el incremento de la síntesis de L-metionina. Por ejemplo, la publicación de patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2000/139471 describe un procedimiento de producción de L-metionina con *Escherichia sp.* de la que se delecionan los genes thrBC y metJ en el genoma, se sobreexpresa metBL y se reemplaza metK por un mutante permeable. Además, la publicación de patente de EE. UU. n.º US2003/0092026 A1 describe un procedimiento que usa un microorganismo con desactivación de metD (inhibidor de la síntesis de L-metionina) que pertenece a *Corynebacterium sp.* La publicación de patente de EE. UU. n.º US2002/0049305 describe un procedimiento para incrementar la producción de L-metionina incrementando la expresión de 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (metF).

La metionina producida por el procedimiento biológico es de tipo L, lo que tiene ventajas, pero la cantidad de producción es demasiado pequeña. Esto se debe a que la vía biosintética de la metionina tiene sistemas de

regulación por retroalimentación muy estrictos. Cuando la metionina se sintetiza a un determinado nivel, la metionina como producto final inhibe la transcripción del gen *metA* que codifica la proteína primaria para el inicio de la biosíntesis de la metionina. La sobreexpresión del gen *metA* en sí no puede incrementar la producción de metionina debido a que el gen *metA* se suprime por la metionina en la fase de transcripción y, a continuación, se degrada por las proteasas intracelulares en la fase de traducción (Dvora Biran, Eyal Gur, Leora Gollan y Eliora Z. Ron: Control of methionine biosynthesis in *Escherichia coli* by proteolysis: Molecular Microbiology (2000) 37(6), 1436-1443). Por lo tanto, muchas de las patentes previas se centran en cómo liberar el gen *metA* de su sistema de regulación por retroalimentación (documentos WO2005/108561, WO1403813).

La publicación de patente de EE. UU. n.º US2005/0054060A1 describe un procedimiento para sintetizar homocisteína o metionina mediante cistationina sintasa modificada (O-succinilhomoserina liasa) que usa metilmercaptano (CH₃SH) o sulfuro de hidrógeno (H₂S) directamente como fuente de azufre, no cisteína. Sin embargo, los expertos en la técnica entienden bien que la cistationina sintasa puede unirse a diversos precursores de metionina en las células y de este modo producir subproductos a alto nivel. Por ejemplo, se informó que la cistationina sintasa acumula altos niveles de homolantionina por reacción secundaria de O-succinilhomoserina y homocisteína (J. Bacteriol (2006) vol. 188:p609-618). Por lo tanto, la sobreexpresión de cistationina sintasa puede reducir la eficacia de la reacción intracelular debido al incremento de su reacción secundaria. Además, este procedimiento tiene muchas desventajas. Este procedimiento usa rutas metabólicas intracelulares que tienen reacciones secundarias y sistemas de regulación por retroalimentación. Además, este procedimiento usa H₂S o CH₃SH, que tienen una gran citotoxicidad para las células. Por lo tanto, el rendimiento de la producción de metionina es comparativamente pequeño.

Para resolver estos problemas, el autor de la presente invención había desarrollado un procedimiento de dos etapas que comprende: una primera etapa de producción de un precursor de L-metionina por fermentación de *E. coli*; y una segunda etapa de conversión del precursor de L-metionina en L-metionina por reacción enzimática (PCT/KR2007/003650). Este procedimiento de dos etapas puede resolver los problemas anteriores, tales como la citotoxicidad de los sulfuros, la regulación por retroalimentación mediante metionina y SAMe, descomposición del producto intermedio por enzimas intracelulares (por ejemplo, cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa y O-acetilhomoserina sulfhidrilasa). Además, en contraposición con el procedimiento de síntesis química de metionina que produce una forma mixta de D-metionina y L-metionina, el procedimiento de dos etapas es muy eficaz produciendo solo L-metionina de forma selectiva.

En este procedimiento de dos etapas, el rendimiento de producción del precursor de metionina es uno de los factores clave para el incremento del rendimiento de la producción de metionina. Para incrementar el rendimiento de la síntesis del precursor de metionina, O-succinil-homoserina, es realmente importante una buena combinación de aspartocinasa fuerte, homoserina transferasa y O-acetilhomoserina transferasa. Con los antecedentes mencionados anteriormente, los autores de la presente invención produjeron un microorganismo que puede producir O-succinilhomoserina caracterizada por lo siguiente: 1) la actividad homoserina O-succiniltransferasa se introduce y potencia, en la que la actividad homoserina O-succiniltransferasa es resistente a la retroalimentación de metionina; y 2) la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa (EC2.7.2.4 o 1.1.1.3) se potencia. Esta cepa es capaz de producir altas concentraciones de precursor de L-metionina independientemente de la concentración de metionina en el medio de cultivo y la producción de precursor de L-metionina puede incrementar extraordinariamente.

El documento WO2008127240 divulga microorganismos que producen metionina y productos relacionados, el documento WO2007077041 divulga un procedimiento para la producción de metionina o sus derivados mediante el cultivo de un microorganismo en un medio de cultivo apropiado, el documento WO2008013432 divulga un procedimiento para la producción de L-metionina y ácido orgánico que comprende etapas específicas, el documento WO200403535617 divulga una homoserina transuccinilasa y el documento JP 2000139471 divulga un procedimiento de producción de L-metionina criando un microorganismo capaz de producir la L-metionina y mediante fermentación usando el propio microorganismo.

Sumario

La presente invención proporciona un microorganismo para producir O-succinilhomoserina, comprendiendo dicho microorganismo:

i) una homoserina O-succiniltransferasa resistente a la inhibición por retroalimentación de metionina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20 o 22;

ii) una actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa (EC2.7.2.4 o 1.1.1.3) incrementada basada en la de una proteína natural; y

iii) una actividad de cistationina gamma sintasa reducida o inactivada basada en la de una proteína natural.

La presente invención también proporciona un procedimiento de producción de O-succinilhomoserina, comprendiendo el procedimiento:

- a) cultivar los microorganismos de acuerdo con la invención en un medio;
- b) acumular la O-succinilhomoserina en el medio o en los microorganismos; y
- c) aislar la O-succinilhomoserina del medio o en los microorganismos.

5 En el presente documento se divulga un microorganismo que puede producir O-succinilhomoserina caracterizado por lo siguiente: 1) la actividad homoserina O-succiniltransferasa se introduce y potencia, en la que la actividad homoserina O-succiniltransferasa es resistente a la retroalimentación de metionina; y 2) la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa (EC2.7.2.4 o 1.1.1.3) se potencia y el procedimiento de producción del precursor de L-metionina usando la cepa.

Breve descripción de los dibujos

10 La aplicación de los modos de realización preferentes de la presente invención se entiende mejor con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 es un diagrama que ilustra la manipulación genética de la cepa productora de precursor de metionina.

La Fig. 2 es un diagrama que ilustra estructuras químicas de un procedimiento de 2 etapas para la producción de metionina.

15 La Fig. 3 es un diagrama esquemático de pMetA-CL para la expresión del gen metA resistente a la retroalimentación.

Descripción detallada

20 En el presente documento se divulga un microorganismo que puede producir precursor de L-metionina caracterizado por lo siguiente: 1) la actividad homoserina O-succiniltransferasa se introduce y potencia, en la que la actividad homoserina O-succiniltransferasa es resistente a la retroalimentación de metionina; y 2) la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa (EC2.7.2.4 o 1.1.1.3) se potencia.

El término "precursor de L-metionina" se define como metabolitos que forman parte de la vía metabólica específica de la metionina o que se pueden derivar de estos metabolitos. En particular, el precursor de L-metionina, como se usa en el presente documento, se refiere a una O-succinil-homoserina.

25 El término "cepa productora de precursor de L-metionina", como se usa en el presente documento, se refiere a una cepa de microorganismo procarionta o eucarionta que puede acumular precursor de L-metionina por manipulación. Por ejemplo, la cepa se puede seleccionar del grupo que consiste en microorganismos de *Escherichia sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Providencia sp.*, *Corynebacteria sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Leptospira sp.*, *Salmonella sp.*, *Brevibacteria sp.*, *Hypomononas sp.*, *Chromobacterium sp.* y *Nocardia sp.* u hongo o levaduras. Preferentemente, los microorganismos de *Escherichia sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Leptospira sp.* y las levaduras se pueden usar para producir O-succinilhomoserina. Más preferentemente, se pueden usar los microorganismos de *Escherichia sp.*, y lo más preferentemente se puede usar *Escherichia coli* (en lo sucesivo referido como "E. coli").

35 En el presente documento se divulga una cepa productora de precursor de L-metionina en la que se deleta o debilita un gen implicado en la descomposición de la O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina original y, en cambio, se introduce o potencia un gen implicado en la síntesis de O-succinilhomoserina que es resistente a la retroalimentación. También se divulga una cepa en la que la vía de biosíntesis de treonina se bloquea o debilita para potenciar la producción de O-succinilhomoserina. También se divulga una cepa en la que se sobreexpresa o potencia la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa. También se divulga una cepa en la que se introduce, sobreexpresa y potencia la actividad homoserina O-succiniltransferasa libre de un sistema de regulación por retroalimentación, y se sobreexpresa o potencia la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa.

40 En el presente documento se divulga una cepa productora de precursor de L-metionina mediante la delección del gen metB implicado en la descomposición del precursor de L-metionina, el gen thrB implicado en la vía de biosíntesis de treonina y el gen metJ que regula la transcripción de los genes de producción del precursor de L-metionina. También se divulga una cepa productora de precursor de L-metionina desactivando el gen metA o metX original implicado en la síntesis de precursor de metionina e introduciendo un metA resistente a la retroalimentación. También se divulga una cepa productora de precursor de L-metionina potenciando la actividad codificada por el gen thrA.

También se divulga una cepa productora de precursor de L-metionina desactivando el gen metA o metX original, introduciendo un gen metA resistente a la retroalimentación y potenciando el gen thrA. Los genes metA que son resistentes a la retroalimentación se introducen y confirman en la patente anterior (PCT/KR2007/003650).

50 En la presente invención, la "inactivación", como se usa en el presente documento, se refiere a una delección o una atenuación del gen. Una delección del gen se realiza cortando una región del gen o modificando la secuencia de la proteína introduciendo una secuencia de genes específica en el cromosoma. El término "atenuación" o "debilitamiento" a este respecto describe la reducción o eliminación de la actividad intracelular de una o más

enzimas (proteínas) en un microorganismo que están codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo reduciendo la actividad de la proteína, modificando una región promotora del gen y la secuencia de nucleótidos de 5'-UTR o introduciendo la mutación en la región ORF del gen diana. Mediante medidas de atenuación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se reduce en general a de un 0 a un 75 %, de un 0 a un 50 %, de un 0 a un 25 %, de un 0 a un 10 % o de un 0 a un 5 % de la actividad o concentración de la proteína natural o de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

Para lograr una atenuación, por ejemplo, la expresión del gen o las propiedades catalíticas de las proteínas de la enzima se pueden reducir o eliminar. Las dos medidas se pueden combinar opcionalmente.

La reducción de la expresión génica puede tener lugar mediante un cultivo adecuado, mediante modificación genética (mutación) de las estructuras de señal de la expresión génica o también mediante la técnica de ARN antisentido. Las estructuras de señal de la expresión génica son, por ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de unión a ribosomas, el codón de inicio y los terminadores. El experto puede encontrar información al respecto, entre otros, por ejemplo, en Jensen y Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58: 191-195 (1998)), en Carrier y Keasling (*Biotechnology Progress* 15: 58-64 (1999)), Franch y Gerdes (*Current Opinion in Microbiology* 3: 159-164 (2000)) y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers ("*Molecular Genetics*", 6ª edición, 1995) o el de Winnacker ("*Genes and Clones*", 1990).

Las mutaciones que dan lugar a un cambio o reducción en las propiedades catalíticas de proteínas enzimáticas son conocidas de la técnica anterior. Ejemplos que se pueden mencionar son los trabajos de Qiu y Goodman (*Journal of Biological Chemistry* 272: 8611-8617 (1997)), Yano *et al.* (*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 5511-5515 (1998)), y Wentz y Schachmann (*Journal of Biological Chemistry* 266: 20833-20839 (1991)). Descripciones resumidas se pueden encontrar en libros de texto de genética y biología molecular conocidos, tales como por ejemplo el de Hagemann ("*General Genetics*", 1986).

Las posibles mutaciones son transiciones, transversiones, inserciones y deleciones. Dependiendo del efecto del intercambio de aminoácidos sobre la actividad de la enzima, se hace referencia a "mutaciones de aminoácido" o mutaciones finalizadoras. Las inserciones o deleciones de al menos un par de bases en un gen dan lugar a "mutaciones de desplazamiento del marco de lectura", que dan lugar a la incorporación de aminoácidos incorrectos o interrupción prematura de la traducción. Si se forma un codón finalizador en la región de codificación como consecuencia de la mutación, esto también da lugar a una terminación prematura de la traducción. Las deleciones de diversos codones típicamente dan lugar a una pérdida completa de la actividad enzimática. Las instrucciones sobre la generación de dichas mutaciones forman parte del estado de la técnica anterior y se pueden encontrar en libros de texto de genética y biología molecular conocidos, tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers ("*Molecular Genetics*", 6ª edición, 1995), el de Winnacker ("*Genes and Clones*", 1990) o el de Hagemann ("*General Genetics*", 1986).

Las mutaciones adecuadas en los genes, tales como, por ejemplo, mutaciones por deleción, se pueden incorporar en cepas adecuadas por reemplazo de genes o alelos.

En la presente invención, el término "potenciación" describe el incremento en la actividad intracelular de una enzima que se codifica por el ADN correspondiente. La potenciación de la actividad intracelular de una enzima se puede lograr mediante la sobreexpresión del gen. La sobreexpresión del gen diana se puede lograr modificando la región promotora del gen o la secuencia de nucleótidos de la región 5'-UTR. La sobreexpresión del gen diana también se puede lograr introduciendo la copia extra del gen diana en el cromosoma, transformando la cepa huésped con el vector que contiene el gen diana con un promotor, o introduciendo la mutación que puede incrementar la expresión en el gen diana. La potenciación de la actividad intracelular de una enzima también se puede lograr introduciendo la mutación en la región ORF del gen diana. Mediante medidas de potenciación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se incrementa en general en al menos un 10 %, un 25 %, un 50 %, un 75 %, un 100 %, un 150 %, un 200 %, un 300 %, un 400 % o un 500 %, hasta a un máximo de un 1000 % o un 2000 %, basado en la de la proteína natural o en la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

Un procedimiento divulgado para preparar una cepa productora de precursor de L-metionina es como sigue;

En la etapa 1, un gen que codifica proteínas tales como cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa se delecciona o debilita en una cepa para acumular precursor de L-metionina tal como O-succinilhomoserina o O-acetilhomoserina.

El gen que codifica la cistationina gamma sintasa se indica como metB, el gen que codifica la O-succinilhomoserina sulfhidrilasa se indica como metZ y el gen que codifica la O-acetilhomoserina sulfhidrilasa se indica como metY. Un gen que codifica la proteína que tiene la actividad mencionada anteriormente se ejemplifica por metB en *Escherichia coli*. La secuencia genómica del gen se puede obtener a partir de la secuencia genómica de *E. coli* (n.º de acceso AAC75876) informada en el informe previo (Blattner *et al.*, *Science* 277: 1453-1462 (1997)). La secuencia genómica anterior también se puede obtener del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y del DDBJ (Banco de

Datos de ADN de Japón). Otros genes que tienen la misma actividad se ejemplifican por metB y metY derivados de *Corynebacterium*, y metZ derivado de *Pseudomonas*.

5 La cistationina gamma sintasa u O-succinilhomoserina sulfhidrilasa o O-acetilhomoserina sulfhidrilasa tiene la actividad de convertir O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina en cistationina u homocisteína como se muestra en las siguientes fórmulas de reacción. Por lo tanto, cuando un gen que tiene esta actividad se deletiona o debilita, la O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina se acumula excesivamente en la solución de cultivo.

L-cisteína + O-succinil-L-homoserina \Leftrightarrow succinato + cistationina

L-cisteína + O-acetil-L-homoserina \Leftrightarrow acetato + cistationina

HS⁻ + O-succinil-L-homoserina \Leftrightarrow succinato + homocisteína

10 HS⁻ + O-acetil-L-homoserina \Leftrightarrow acetato + homocisteína

En la etapa 2, el gen thrB de codificación de la homoserina cinasa en la cepa preparada en la etapa 1 se deletiona o debilita. El gen thrB está implicado en la síntesis de O-fosfohomoserina a partir de homoserina, que a continuación se convierte en treonina por el gen thrC. El gen thrB se deletiona o debilita para usar toda la homoserina intracelular para la síntesis del precursor de metionina.

15 En la etapa 3, un regulador de transcripción de la vía sintética de metionina se deletiona o debilita. El gen metA, metB, metC, metE y metF implicado en la síntesis de metionina se reprime mediante el sistema de regulación por retroalimentación. El gen metJ es un gen regulador de transcripto típico en *E. coli*. Para permitir la sobreexpresión del gen metA o metX para sintetizar el precursor de metionina, se debe eliminar el metJ. Por lo tanto, si el gen metJ se elimina en *E. coli*, la expresión del gen metA o metX siempre incrementa, lo que da lugar a la producción en masa de precursor de L-metionina.

20 Las etapas 2 y 3 anteriores se pueden modificar o eliminar de acuerdo con una cepa productora de precursor. Sin embargo, se puede ejecutar más preferentemente para potenciar la vía de producción de precursor en el microorganismo de *Escherichia sp.*

25 En la etapa 4 se introduce la homoserina O-succiniltransferasa resistente a la retroalimentación, que media en el primer proceso de la vía de biosíntesis de la metionina. MetA es una designación común del gen que codifica la proteína que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa. La actividad homoserina O-succiniltransferasa resistente a la retroalimentación es el resultado del gen metA resistente a la retroalimentación mutante. El documento PCT/US2007/009146 divulga el procedimiento para preparar el gen metA resistente a la retroalimentación. En la presente invención, la secuencia de aminoácidos codificada por el gen metA 10 resistente a la retroalimentación está representada en SEQ ID NO: 14, por el gen metA 11 está representada en SEQ ID NO: 16, por el gen metA 32 está representada en SEQ ID NO: 18, por el gen metA 37 está representada en SEQ ID NO: 20, por el gen metA41 está representada en SEQ ID NO: 22 (PCT/US2007/009146). También se divulga un péptido homoserina O-succiniltransferasa con número de acceso a GenBank: AP 004514 que tiene mutaciones en las posiciones de aminoácidos 24, 29, 79, 114, 140, 163, 222, 275, 290, 291, 295, 297, 304, 305 o combinaciones de las mismas.

35 La introducción o potenciación del gen metA se realiza introduciendo el gen o modificando una región promotora del gen y la secuencia de nucleótidos de 5'-UTR o introduciendo la mutación en la región ORF del gen diana. La introducción de un gen metA mutante que está libre de un sistema de regulación por retroalimentación da como resultado el incremento de la síntesis del precursor de L-metionina independientemente de la concentración de metionina en el medio de cultivo.

40 Además, la producción de O-succinilhomoserina se puede incrementar más deletionando el gen metA original en el cromosoma y a continuación introduciendo un gen metA mutante en el mismo. El gen metA resistente a la retroalimentación bajo el promotor metA que se potencia al deletionar el gen metJ puede producir más O-succinilhomoserina.

45 En la etapa 5, la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa se potencia para incrementar la síntesis de homoserina, precursora de O-succinilhomoserina. El thrA es una designación común del gen que codifica el péptido que tiene actividad aspartocinasa y homoserina deshidrogenasa. La potenciación de la actividad de thrA se realiza introduciendo la mutación en el gen thrA o mediante la integración múltiple del gen thrA en el cromosoma o introduciendo el plásmido que contiene el gen thrA.

50 Preferentemente, una aspartocinasa y homoserina deshidrogenasa está codificada por el gen con n.º en la base de datos Unipro: AP_000666 (*E. coli* thrA). Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos codificada por el gen thrA está representada en SEQ ID NO: 29, que tiene mutación en la posición de aminoácido 345. La modificación y potenciación del thrA se realiza introduciendo la mutación en el gen thrA o introduciendo además el gen diana en el cromosoma o introduciendo además el plásmido procesado.

La O-succinilhomoserina, que es el precursor de L-metionina se puede acumular en una cepa aprovechando una parte o todo el procedimiento de la etapa 1 a la etapa 5 anteriores.

La cepa productora de precursor de L-metionina se puede preparar a partir de la cepa productora de L-lisina, L-treonina o L-soleucina. Preferentemente, se puede preparar usando la cepa productora de L-treonina. Con esta cepa, la síntesis de homoserina es más fácil y la producción de precursor de metionina se incrementa como resultado. Así, el precursor de metionina se puede acumular delecionando o debilitando un gen implicado en la vía de biosíntesis de treonina y, a continuación, el gen *metA* o *metY* o *MetZ*, usando la cepa productora de L-treonina. Es más preferente delecionar o debilitar primero el gen *thrB* y a continuación el *metB*, *metY* o *metZ* para sintetizar el precursor de metionina.

El término "cepa productora de L-treonina" de la invención se refiere a una cepa de microorganismo procarionta o eucariota que es capaz de producir L-treonina *in vivo*. Por ejemplo, la cepa puede incluir cepas de microorganismos productores de L-treonina que pertenecen a *Escherichia sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Providencia sp.*, *Corynebacterium sp.* y *Brevibacterium sp.* Entre estos, el microorganismo *Escherichia sp.* es preferente y *Escherichia coli* es más preferente.

CJM002, la cepa productora de L-treonina e independiente de L-metionina transformada a partir de TF4076 (KFCC 10718, patente coreana n.º 92-8365), la cepa mutante de *E. coli* productora de L-treonina, se usó en los ejemplos. La cepa TF4076 tiene un requerimiento de metionina y es resistente a análogos de metionina (por ejemplo, ácido α -amino- β -hidroxil valérico, AHV), análogos de lisina (por ejemplo, S-(2-aminoetil)-L-cisteína, AEC) y análogos de isoleucina (por ejemplo, ácido α -aminobutílico). La cepa TF4076 no es capaz de sintetizar metionina *in vivo* porque es la cepa la que tiene un requerimiento de metionina. Para usar esta cepa como la cepa productora de precursor de metionina de la invención libre de requerimiento de metionina, los presentes inventores prepararon la cepa de *E. coli* productora de L-treonina CJM002 libre de requerimiento de metionina mediante mutación artificial usando NTG. La cepa *E. coli* CJM002 fue nombrada como *Escherichia coli* MF001 y fue depositada en KCCM (Korean Culture Center of Microorganism, Eulim Buld., Hongje-1-Dong, Seodaemun-Ku, Seúl, 361-221, Corea) el 9 de abril de 2004 (n.º de acceso: KCCM-10568). En la presente invención se delecionaron los genes *metB*, *thrB*, *metJ* y *metA* de la cepa *E. coli* CJM002 y, a continuación, se introdujo el gen *metA* resistente a la retroalimentación. La cepa productora de precursor de L-metionina resultante construida usando *E. coli* CJM002 se denominó CJM-A11. La cepa CJM-A11 se transformó con el vector de expresión de *thrA* y se denominó CJM-A11 (*pthrA(M)-CL*). La cepa productora de O-succinil-homoserina, *Escherichia coli* CJM-A11, preparada mediante el procedimiento anterior se depositó el 23 de enero de 2008, con n.º de acceso KCCM 10922P.

FTR2533, que es la cepa productora de L-treonina divulgada en PCT/KR2005/00344, se usó en los ejemplos. La cepa FTR2533 se derivó de *Escherichia coli* TFR7624 que se derivó de *Escherichia coli* con n.º de acceso KCCM 10236. Y la cepa de *Escherichia coli* con n.º de acceso KCCM 10236 que se derivó de *Escherichia coli* TF4076. La cepa de *Escherichia coli* con n.º de acceso KCCM 10236 es capaz de expresar niveles más altos de los genes *ppc* que catalizan la formación de oxaloacetato a partir de PEP y las enzimas necesarias para la biosíntesis de treonina a partir de aspartato, por ejemplo, *thrA*: aspartocinasa 1-homoserina deshidrogenasa, *thrB*: homoserina cinasa, *thrC*: treonina sintasa, permitiendo de este modo un incremento en la producción de L-treonina. Y la cepa de *Escherichia coli* FTR7624 (KCCM10538) tiene un gen *tyrR* inactivado que regresa la expresión del gen *tyrB* necesario para la biosíntesis de L-treonina. Y la cepa de *Escherichia coli* FTR2533 (KCCM10541) es la cepa productora de L-treonina que tiene un gen *galR* inactivado, la cepa mutante de *E. coli* productora de L-treonina.

Se delecionaron los genes *metB*, *thrB*, *metJ* y *metA* de *E. coli* FTR2533 y, a continuación, se introdujo el gen *metA* resistente a la retroalimentación. La cepa productora de precursor de L-metionina resultante construida usando *E. coli* FTR2533 se denominó CJM2-A11. La cepa CJM2-A11 se transformó con el vector de expresión de *thrA* y se denominó CJM2-A11 (*pthrA(M)-CL*).

La cepa *Escherichia coli* CJM2-A11 (*pthrA(M)-CL*) se depositó el 12 de febrero de 2008, con el n.º de acceso KCCM 10924P.

Se divulga un procedimiento para producir precursor de L-metionina, comprendiendo el procedimiento: a) fermentación de los microorganismos anteriores; b) enriquecimiento del precursor de L-metionina en el medio o en los microorganismos; y c) aislamiento del precursor de L-metionina.

El cultivo de la cepa productora de precursor de L-metionina preparado anteriormente se puede realizar en un medio apropiado y con condiciones conocidas por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica entienden bien que el procedimiento de cultivo se puede usar ajustando fácilmente de acuerdo con la cepa seleccionada. Por ejemplo, el procedimiento de cultivo incluye, pero sin limitarse a, cultivo por lotes, cultivo continuo y cultivo por lotes alimentados. En la siguiente referencia se describe una variedad de procedimientos de cultivo: "Biochemical Engineering" por James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp 138-176.

El medio tiene que cumplir las condiciones de cultivo para una cepa específica. En la siguiente referencia se describe una variedad de medios de cultivo de microorganismos: "Manual of Methods for General Bacteriology" por la American Society for Bacteriology, Washington D.C., EE. UU., 1981. Dichos medios incluyen diversas fuentes de

5 carbono, fuentes de nitrógeno y oligoelementos. La fuente de carbono se ejemplifica por hidratos de carbono tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, 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 tales como ácido acético. Uno de estos compuestos o una
 10 mezcla de los mismos se puede usar como fuente de carbono. La fuente de nitrógeno se ejemplifica por una fuente de nitrógeno orgánica tal como peptona, extracto de levadura, salsa de carne, extracto de malta, licor de maíz fermentado (CSL) y harina de judía y por una fuente de nitrógeno inorgánico como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Uno de estos compuestos o una mezcla de los mismos se puede usar como fuente de nitrógeno. El medio en el presente documento puede incluir
 15 adicionalmente dihidrógeno fosfato de potasio, hidrógeno fosfato de dipotasio y las correspondientes sales de sodio como una fuente de fosfato. El medio también puede incluir una sal metálica tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, también se pueden añadir aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Los medios o los precursores se pueden añadir al cultivo por lotes o de forma continua.

20 El pH del cultivo se puede ajustar durante el cultivo añadiendo de manera apropiada un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. La generación de burbujas de aire se puede inhibir durante el cultivo mediante el uso de un agente antiespumante tal como el éster de poliglicol de ácido graso. Para mantener la condición aeróbica del cultivo, se puede inyectar oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) al cultivo. La temperatura del cultivo es convencionalmente de 20 a 45 °C, preferentemente de 25 a 40 °C. El período de cultivo se puede mantener hasta que la producción de precursor de L-metionina alcance un nivel deseado, y el tiempo de cultivo preferente es de 10 a 160 horas.

Ejemplificación

Los modos de realización prácticos y actualmente preferentes de la presente invención son ilustrativos, como se muestra en los siguientes Ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

25 Ejemplo 1: Construcción de una cepa productora de precursor de metionina

<1-1> Delección del gen metB

30 Para delecionar el gen metB que codifica cistationina sintasa en la cepa de *E. coli*, se realizó una delección por PCR de FRT en una etapa (PNAS (2000) vol.97: P6640-6645). Se usaron cebadores de la SEQ ID NO: 1 y NO: 2 para la PCR usando el vector pKD3 (PNAS (2000) vol.97: P6640-6645) como plantilla, lo que da como resultado la construcción del casete de delección. La PCR se realizó como sigue: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto.

35 El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %, seguido de purificación del ADN obtenido de la banda de 1,2 kbp. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en *E. coli* (K12) W3110 transformado con el vector pKD46 (PNAS (2000) vol.97: P6640-6645). Antes de la electroporación, W3110 transformado con pKD46 se cultivó a 30 °C en medio LB que contenía 100 µg/l de ampicilina y 5 mM de L-arabinosa hasta que OD₆₀₀ alcanzó 0,6. A continuación, la cepa cultivada se lavó dos veces con agua destilada esterilizada y una vez más con glicerol al 10 %. La electroporación se realizó a 2500 V. La cepa recuperada se sembró en estrías en medio de placa LB que contenía 25 µg/l de cloranfenicol, seguido de cultivo a 37 °C durante la noche. A continuación, se seleccionó una cepa que exhibía resistencia al cloranfenicol.

40 La PCR se realizó usando la cepa seleccionada como plantilla con los cebadores n.º 1 y 2 en las mismas condiciones. La delección del gen metB se identificó confirmando el gen de 1,2 kb de tamaño en un gel de agarosa al 1,0 %. La cepa se transformó a continuación con el vector pCP20 (PNAS (2000) vol.97: P6640-6645) y se cultivó en medio LB para eliminar el gen marcador de cloranfenicol. Se construyó la cepa con metB desactivado final en la que el tamaño del gen metB se redujo a 150 pb en gel de agarosa al 1,0 % mediante PCR en las mismas condiciones.
 45 La cepa construida se denominó W3-B.

<1-2> Delección del gen thrB

50 Los autores de la invención intentaron incrementar la síntesis de O-succinilhomoserina a partir de la homoserina mediante la delección del gen thrB que codifica homoserina cinasa. En particular, cuando la cepa productora de treonina se usa como un huésped de producción de O-succinilhomoserina, la delección del gen thrB es necesaria porque la conversión de homoserina en O-fosfohomoserina por este gen es muy fuerte. Para delecionar el gen thrB en la cepa W3-B construida anteriormente, la delección por PCR de FRT en una etapa se realizó de la misma manera que como se describe anteriormente para la delección del gen metB.

55 Para construir el casete de delección de thrB, se realizó una PCR usando el vector pKD4 (PNAS (2000) vol.97: P6640-6645) como plantilla con cebadores de SEQ ID NO: 3 y NO: 4 como sigue: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %, seguido de purificación del ADN obtenido de la banda de 1,6 kbp. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa W3-B

transformada con el vector pKD46. La cepa recuperada se sembró en estrías en medio de placa LB que contenía 50 µg/l de kanamicina, seguido de cultivo a 37 °C durante toda la noche. A continuación, se seleccionó una cepa que exhibía resistencia.

5 La PCR se realizó usando la cepa seleccionada como plantilla con los cebadores de SEQ ID NO: 3 y NO: 4 en las mismas condiciones que anteriormente. La delección del gen ThrB se identificó seleccionando la cepa cuyo tamaño es de 1,6 kb en gel de agarosa al 1,0 %. La cepa se transformó a continuación con el vector pCP20 y se cultivó en medio LB. Se construyó la cepa con thrB desactivado final en la que el tamaño del gen thrB se redujo a 150 kb en gel de agarosa al 1,0 % mediante PCR en las mismas condiciones. Se confirmó que el marcador de kanamicina se había eliminado. La cepa construida se denominó W3-BT.

10 <1-3> Delección del gen metJ

Para deleccionar el gen metJ que es el gen regulador del gen metA implicado en la síntesis del precursor de metionina, se realizó una delección por PCR de FRT en una sola etapa de la misma manera que se usó para la delección del gen metB.

15 Para construir el casete de delección de metJ, la PCR se realizó con cebadores de SEQ ID NO: 5 y NO: 6 como sigue: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto.

20 El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %, seguido de purificación del ADN obtenido de la banda de 1,2 kbp. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa W3-BT transformada con el vector pKD46. La cepa recuperada se sembró en medio de placa LB que contenía cloranfenicol, seguido de cultivo a 37 °C durante la noche. A continuación, se seleccionó una cepa que exhibía resistencia.

25 La PCR se realizó usando la cepa seleccionada como plantilla con los cebadores de SEQ ID NO: 7 y NO: 8 en las mismas condiciones que anteriormente. La delección del gen metJ se identificó confirmando el gen de 1,6 kb de tamaño en un gel de agarosa al 1,0 %. La cepa se transformó a continuación con el vector pCP20 y se cultivó en medio LB. Se construyó la cepa con metJ desactivado final en la que el tamaño del gen metJ se redujo a 600 kb en gel de agarosa al 1,0 % mediante PCR en las mismas condiciones y se confirmó que la cepa de marcador de cloranfenicol se había eliminado. La cepa construida se denominó W3-BTJ.

<1-4> Delección del gen metA

Para introducir un gen metA resistente a la retroalimentación en el cromosoma, el gen metA cromosómico original se eliminó en la cepa W3-BTJ. Para eliminar el gen metA, se realizó una delección por PCR de FRT en una sola etapa.

30 Para construir el casete de delección de metA, la PCR se realizó con cebadores de SEQ ID NO: 9 y NO: 10 como sigue: 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto.

35 El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %, seguido de purificación del ADN obtenido de la banda de 1,2 kbp. El fragmento de ADN recuperado sometió a electroporación en la cepa *E. coli* W3-BTJ transformada con el vector pKD46. La cepa recuperada se sembró en medio de placa LB que contenía cloranfenicol, seguido de cultivo a 37 °C durante la noche. A continuación, se seleccionó una cepa que exhibía resistencia.

40 La PCR se realizó usando la cepa seleccionada como plantilla con los cebadores de SEQ ID NO: 9 y NO: 10 en las mismas condiciones que anteriormente. La delección del gen metA se identificó confirmando el gen de 1,1 kb de tamaño en un gel de agarosa al 1,0 %. La cepa se transformó a continuación con el vector pCP20 y se cultivó en medio LB. Se construyó la cepa con metA desactivado final en la que el tamaño del gen metA se redujo a 100 kb en gel de agarosa al 1,0 % mediante PCR en las mismas condiciones. Se confirmó que el marcador de cloranfenicol se había eliminado. La cepa construida se denominó W3-BTJA.

<1-5> Introducción del gen metA resistente a la retroalimentación

45 Para incrementar la producción de O-succinilhomoserina, que es el precursor de L-metionina, se realizó la sobreexpresión del gen metA resistente a la retroalimentación que codifica homoserina O-succiniltransferasa. El documento PCT/US2007/009146 divulga el procedimiento para preparar el gen metA resistente a la retroalimentación y la actividad del mismo.

50 La secuencia del gen metA 10 resistente a la retroalimentación está representada en SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen está representada en SEQ ID NO: 14. La secuencia del gen metA 11 está representada en SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen está representada en SEQ ID NO: 16. La secuencia del gen metA 32 está representada en SEQ ID NO: 17 y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen está representada en SEQ ID NO: 18. La secuencia del gen metA 37 está representada en SEQ ID NO: 19 y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen está representada en SEQ ID NO: 20. La

secuencia del gen *metA* 41 está representada en SEQ ID NO: 21 y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen está representada en SEQ ID NO: 22 (PCT/US2007/009146).

La PCR se realizó usando los genes anteriores como plantilla con cebadores de SEQ ID NO: 11 y NO: 12 como sigue: 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 2 minutos

El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %, seguido de purificación del ADN obtenido de la banda de 1,2 kbp. Después del aislamiento del fragmento de ADN, el vector pCL1920 se escindió con la enzima de restricción *Sma*I y se ligó al fragmento de ADN aislado. La *E. coli* se transformó con el vector y las células portadoras de plásmidos se seleccionaron en agar LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina. El vector construido se muestra en la Fig. 3.

El vector se sometió a electroporación en la cepa W3-BTJA y se verificó la capacidad de producción de la cepa usando el cultivo en matraz Erlenmeyer como se describe en el Ejemplo 2-1. Se midió la producción de O-succinilhomoserina de la cepa modificada, basada en el 100 % de producción de O-succinilhomoserina de la cepa natural. Como resultado, la producción de O-succinilhomoserina de todas las cepas modificadas fue significativamente mayor que la de las cepas naturales, en particular, *metA* 11, *metA* 10 y *metA* 32 muestran la producción más eficaz.

Tabla 1. Resistencia a la retroalimentación de *metA* mutante en presencia de metionina 100 mM.

% de retención de actividad específica	.t.	n.º 10	n.º 11	n.º 32	n.º 37	n.º 41
Control	00	100	100	100	100	100
con Met 100 mM	0,6	97	94	79	83	74

Tabla 2. Producción de O-succinilhomoserina de *metA* resistente a la retroalimentación en la cepa W3-BTJA.

<i>metA</i>	Producción de O-succinilhomoserina (%)
wt	100
n.º 10	392
n.º 11	425
n.º 32	396
n.º 37	227
n.º 41	389

Para la expresión estable de pMetA10-CL, pMetA11-CL y pMetA32-CL que muestran la producción más eficaz, estos genes se insertaron en el cromosoma de *E. coli*.

En primer lugar, el gen con marcador de cloranfenicol se amplificó por PCR usando el vector pKD3 como plantilla con cebadores de SEQ ID NO: 23 y NO: 24. El fragmento de PCR se aisló por elución en gel. El gen *metA* se amplificó por PCR con cebadores de SEQ ID NO: 9 y NO: 10 y la región 3'UTR del gen *metA* se amplificó por PCR usando el cromosoma W3110 natural como plantilla con cebadores de SEQ ID NO: 25 y NO: 26. Cada uno de los fragmentos de PCR se aisló por elución en gel y la mezcla de fragmentos se amplificó por PCR con cebadores de SEQ ID NO: 9 y NO: 26, produciendo de este modo el fragmento del gen *metA* que contiene el marcador de cloranfenicol. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa W3BTJA transformada con el vector pKD46 y se seleccionaron las cepas resistentes al cloranfenicol y se detectó la clonación exitosa del gen *metA* usando SEQ ID NO: 9 y NO: 10. Las cepas identificadas que introdujeron el gen *metA* 10, 11, 32 modificado se denominaron W3BTJ-A10, 11 y 32, respectivamente. La producción de O-succinilhomoserina de cada cepa fue similar a la de la cepa W3-BTJA que alberga cada plásmido *metA*.

<1-6> Sobreexpresión del gen *thrA*

Para incrementar la producción de O-succinilhomoserina más eficazmente, se realizó la sobreexpresión del gen *thrA*.

Para ello, el gen *thrA* se amplificó por PCR usando el cromosoma de *E. coli* CJM002 (KCCM10568), la cepa productora de L-treonina, como una plantilla con cebadores de SEQ ID NO: 27 y NO: 28. El fragmento de ADN amplificado se aisló por elución en gel y se ligó con el promotor CJ1 en el vector pCL1920 usando la enzima de restricción *EcoRV*. La *E. coli* se transformó con el vector ligado y las células portadoras de plásmidos se seleccionaron en agar LB que contenía 50 µg/l de espectinomicina. El vector se denominó pCJ-*thrA*(M)-CL. La secuencia de aminoácidos codificada por el gen *thrA* está representada en SEQ ID NO: 29, que tiene mutación en la posición de aminoácido 345. Además, el gen *thrA* natural de la cepa *E. coli* W3110 se amplificó por PCR de la

5 misma manera que como se describe anteriormente y se clonó en el vector denominado pCJ-thrA-CL. Los vectores se sometieron a electroporación en W3BTJA11, respectivamente, y la producción de O-succinilhomoserina de cada cepa se verificó usando el procedimiento de cultivo en matraz como se describe en el Ejemplo 2-1. Como resultado, la cepa transformada con el vector que contiene la forma mutante del gen thrA acumuló niveles significativamente altos de O-succinilhomoserina.

Tabla 3. Producción de O-succinilhomoserina en presencia del vector de expresión de thrA.

	Plásmido	Producción de OSH (%)
W3BTJA11	pCL1920	100
	pCJ-thrA-CL	119
	pCJ-thrA(M)-CL	153

<1-7> Conversión de la cepa productora de L-treonina

10 La cepa productora de O-succinilhomoserina se construyó usando *E. coli* CJM002 (KCCM10568), que es la cepa productora de L-treonina e independiente de L-metionina, como se describe en los Ejemplos 1-1 a 1-5. La cepa que contiene el gen metA mutante en el cromosoma se denominó CJM-A10, CJM-A11 y CJM-A32, respectivamente. Y se construyó otra cepa productora de precursor de L-metionina usando la cepa FTR2533 (KCCM10541) descrita divulgada en PCT/KR2005/00344 por los Ejemplos 1-1 a 1-5 anteriores y se denominó CJM2-A11. Cada cepa se transformó con el vector de expresión de thrA como se describe en el Ejemplo 1-6. La producción del precursor de metionina de estas cepas se midió mediante el procedimiento de cultivo en matraz descrito en el Ejemplo 2-1. Como resultado, la cepa CJM-A11 que alberga el plásmido pCJ-thrA(m)-CL mostró una producción de O-succinilhomoserina significativamente mayor.

[Tabla 4] Producción de precursor (O-succinilhomoserina) de metionina mediante cultivo en matraz

<i>O-succinilhomoserina (%)</i>	
CJM-A10	100
CJM-A11	113
CJM-A32	80
CJM2-A11	94
CJM-A11 (pCJ-thrA(m)-CL)	127

Ejemplo 2: Fermentación para la producción de precursor de L-metionina

<2-1> Experimento de cultivo en matraz.

20 Para medir la producción de precursor de metionina de cada cepa construida en el Ejemplo 1 se realizó un cultivo en matraz Erlenmeyer. Cada cepa se cultivó en medio de placa LB a 31 °C durante la noche. Se inoculó una única colonia en 3 ml de medio LB, seguido de cultivo a 31 °C durante 5 horas. La solución de cultivo se diluyó 200 veces en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 25 ml de medio productor de precursor de metionina, seguido de cultivo a 31 °C, 200 rpm durante 64 horas. Se realizó HPLC para comparar con la capacidad de producción de precursor de metionina (Tabla 2 y Tabla 3). Como resultado, la capacidad de producción de metionina se incrementó significativamente en la cepa productora de precursor de metionina preparada a partir de la cepa productora de L-treonina libre del requisito de metionina.

[Tabla 1]

Composición del medio del matraz para la producción de precursor de metionina	
Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	40 g
Sulfato de amonio	17 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ • 7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ • 8H ₂ O	5 mg

Composición del medio del matraz para la producción de precursor de metionina	
Composición	Concentración (por litro)
ZnSO ₄	5 mg
Composición	Concentración (por litro)
Carbonato de calcio	30 g
Extracto de levadura	2 g
Metionina	0,15 g
Treonina	0,15 g

<2-2> Fermentación a gran escala

Se seleccionaron algunas cepas que exhiben una mayor capacidad de producción de O-succinilhomoserina y se cultivaron en un fermentador de 5 l para producir O-succinilhomoserina en masa. Cada cepa se inoculó en medio LB que contenía espectinomicina, seguido de cultivo a 31 °C durante la noche. A continuación, se inoculó una única colonia en 10 ml de medio LB que contenía espectinomicina, que se cultivó a 31 °C durante 5 horas. La solución de cultivo se diluyó 100 veces en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml que contenía 200 ml de medio de siembra de precursor de metionina, seguido de cultivo a 31 °C, 200 rpm durante 3 a 10 horas. La solución de cultivo se inoculó en un fermentador de 5 l, seguido de cultivo adicional durante 20 a 100 horas mediante fermentación por lotes alimentados. La concentración de precursor de metionina en la solución fermentada se midió por HPLC y los resultados se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 3]

Composición del medio del fermentador para la producción de precursor de metionina			
Composición	Medio de siembra	Medios principales	Medios de alimentación
Glucosa (g/l)	10,1	40	600
MgSO ₄ • 7H ₂ O (g/l)	0,5	4,2	
Extracto de levadura (g/l)	10	3,2	
KH ₂ PO ₄	3	3	8
Sulfato de amonio (g/l)		6,3	
NH ₄ Cl (g/l)	1		
NaCl (g/l)	0,5		
Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O (g/l)	5,07		
DL-Metionina (g/l)		0,5	0,5
L-Isoleucina (g/l)	0,05	0,5	0,5
L-Treonina (g/l)		0,5	0,5

[Tabla 4] Producción de precursor de metionina en un fermentador

	O-succinilhomoserina (g/l)
CJM-BTJ/pCJ-MetA-CL	>80
CJM-A11/ pCJ-thrA(M)-CL	>100
CJM2-A11/pCJ-thrA(M)-CL	>90

Aplicabilidad industrial

Como se ha descrito hasta ahora, el uso de la cepa productora de precursor de metionina divulgada en el presente documento, la metionina se puede producir de forma más respetuosa con el medio ambiente que el procedimiento de síntesis química de metionina convencional. Y la L-metionina obtenida por conversión de O-succinilhomoserina producida a partir de la cepa divulgada en el presente documento se puede usar ampliamente en la producción de

piensos o aditivos de piensos, además de alimentos en la producción de alimentos para humanos o aditivos de alimentos.

Cláusulas que ilustran adicionalmente las divulgaciones del presente documento:

- 5 Cláusula 1. Un microorganismo derivado de *Escherichia sp.* que puede producir O-succinilhomoserina caracterizada por lo siguiente: 1) la actividad homoserina O-succiniltransferasa (EC2.3.1.46) se introduce y potencia, en la que la actividad homoserina O-succiniltransferasa es resistente a la retroalimentación de metionina; y 2) la actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa (EC2.7.2.4 o 1.1.1.3) se potencia.
- 10 Cláusula 2. El microorganismo de la cláusula 1, en el que el péptido homoserina O-succiniltransferasa con número de acceso a GenBank: AP 004514 tiene mutaciones en las posiciones de aminoácidos 24, 29, 79, 114, 140, 163, 222, 275, 290, 291, 295, 297, 304, 305 o combinaciones de las mismas.
- Cláusula 3. El microorganismo de la cláusula 1, en el que el péptido homoserina O-succiniltransferasa tiene la SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20 o 22.
- Cláusula 4. El microorganismo de la cláusula 1, en el que el péptido aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa tiene una mutación en la posición de aminoácido 345.
- 15 Cláusula 5. El microorganismo de la cláusula 1, en el que el péptido aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa tiene una SEQ ID NO: 29.
- Cláusula 6. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que el microorganismo se deriva de la cepa productora de L-treonina, L-isoleucina o L-lisina.
- Cláusula 7. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.
- 20 Cláusula 8. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que la cistationina gamma sintasa, la O-succinilhomoserina sulfhidrilasa o la O-acetilhomoserina sulfhidrilasa están debilitadas o inactivadas.
- Cláusula 9. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que la homoserina cinasa está debilitada o inactivada.
- Cláusula 10. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que el regulador de transcripción de las vías sintéticas de metionina está debilitado o inactivado.
- 25 Cláusula 11. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que la actividad homoserina O-acetiltransferasa original o la actividad homoserina O-succiniltransferasa original están debilitadas o inactivadas.
- Cláusula 12. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que el gen metB que codifica cistationina gamma sintasa, el gen thrB que codifica homoserina cinasa y el gen metJ que es regulador de la transcripción del gen metA están debilitados o inactivados.
- 30 Cláusula 13. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que la cepa productora de precursor de L-metionina se deriva de la cepa productora de treonina *Escherichia coli* MF001 libre de dependencia de metionina (n.º de acceso: KCCM 10568).
- Cláusula 14. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que la cepa productora de precursor de L-metionina se deriva de la cepa productora de treonina *Escherichia coli* FTR2533 (n.º de acceso: KCCM 10541).
- 35 Cláusula 15. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que la cepa productora de precursor de L-metionina es *Escherichia coli* CJM-A11 (pthrA(m)-Cl) (KCCM 10922P), la cepa productora de O-succinilhomoserina.
- Cláusula 16. El microorganismo de acuerdo con la cláusula 1, en el que la cepa productora de precursor de L-metionina es *Escherichia coli* CJM2-A11 (pthrA(m)-Cl) (KCCM 10924P), la cepa productora de O-succinilhomoserina.
- 40 Cláusula 17. Un procedimiento de producción de O-succinilhomoserina, comprendiendo el procedimiento: a) fermentación de los microorganismos de acuerdo con cualquier cláusula seleccionada de la cláusula 1 a la cláusula 18; b) enriquecimiento de la O-succinilhomoserina en el medio o en los microorganismos; y c) aislamiento de la O-succinilhomoserina.

45 **Listado de secuencias**

<110> CJ Corporation

<120>

<160>

ES 2 736 529 T3

- <170>
<210> 1
<211> 71
<212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador para amplificación de cloranfenicol
<400> 1
TTACTCTGGT GCCTGACATT TCACCGACA AAGCCCAGGG AACTTCATCA Cgtgtaggct ggagctgct c
- 10 <210> 2
<211> 71
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
- 15 <223> cebador para amplificación de cloranfenicol
<400> 2
TTACCCCTTG TTTGCAGCCC GGAAGCCATT TTCCAGGTCTG GCAATTAATA Tcatatgaat atcctccta g
- <210> 3
<211> 72
- 20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador para amplificación de kanamicina
<400> 3
AAAGAATATG CCGATCGGTT CGGGCTTAGG CTCCAGTGC CTGTTCCGGTG Ggtgtaggct ggagctgct tc
- 25 <210> 4
<211> 74
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> cebador para amplificación de kanamicina
<400> 4
AGACAACCGA CATCGCTTTC AACATTGGCG ACCGGAGCC GGAAGGCA AAcatatga atcctcc ttag
- <210> 5
- 35 <211> 71
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

ES 2 736 529 T3

- <223> cebador para amplificación de cloranfenicol
<400> 5 atggctgaat ggagcggcga atatatcagc ccatagctg agcacggcaa ggtgtaggct ggagctgctt c
<210> 6
<211> 65
- 5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador para amplificación de cloranfenicol
<400> 6 gtattccac gtctccgggt taatcccat ctacgcatg atctccat gaatacctc ctag
- 10 <210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<220>
- 15 <223> cebador para amplificación de metJ
<400> 7
gggcttgtc ggtgaaatg
<210> 8
<211> 19
- 20 <212> ADN
<213> Escherichia coli
<220>
<223> cebador para amplificación de metJ
<400> 8
actttgcat gagcgagag
- 25 <210> 9
<211> 70
<212> ADN
<213> ADN artificial
- 30 <220>
<223> cebador para delección de metA
<400> 9 CAATTCTTGCGTGAAGAAAACGTCTTTGTGATGACAACTTCTCGTGCGTgtgtaggctggagctgctc
<210> 10
<211> 70
- 35 <212> ADN
<213> ADN artificial

ES 2 736 529 T3

<220>
<223> cebador para delección de metA
<400> 10
AATCCAGCGTTGGATTCATGTGCCGTAGATCGTATGGCGTGATCTGGTAGcatatgaatatcctccttag

5 <210> 11
<211> 28
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<220>

10 <223> cebador para amplificación de metA
<400> 11 aatggatccT GCCGTGAGCG GCGAATAC
<210> 12
<211> 28
<212> ADN

15 <213> Escherichia coli
<220>
<223> cebador para amplificación de metA
<400> 12 agctctagaC TGCTGAGGTA CGTTTCGG
<210> 13

20 <211> 930
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 13

ES 2 736 529 T3

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcggtga agaaaacgtc 60
 tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccgcttaa gtttctgac 120
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgcct gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgtcgcttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420
 gtctgctggg cggtagagc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaacaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggctgcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggagaaggg ggatgcatat 660
 ctgttagcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg 780
 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accggatcac gccatagat 900
 ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa 930

<210> 14

<211> 309

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 14

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg

1

5

10

15

ES 2 736 529 T3

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

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

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

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

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

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala
130 135 140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
145 150 155 160

ES 2 736 529 T3

Thr Glu Gln Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His

165 170 175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser

180 185 190

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu

195 200 205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Leu Ala Ser

210 215 220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala

225 230 235 240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp

245 250 255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr

260 265 270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp

275 280 285

Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Arg Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met

290 295 300

Asn Pro Thr Leu Asp

305

ES 2 736 529 T3

<210> 15
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 15
 atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcggtga agaaaacgtc 60
 tttgtgatgt caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgacg 120
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtogatat tcagctggtg cgcacgatt ctcgtgaatc gcgcaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggccctggtg agtttaaatga tgcgcttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420
 gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggagaaggg ggatgcatat 660
 ctgtttgccg gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg 780
 tataactatt tcccgcaaaa tgatccgcaa aatacaccgc gagagagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcgc gccatacgat 900
 ctacggcaca tgtatccaac gctggattaa 930

<210> 16
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 16

ES 2 736 529 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
 100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
 115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala
 130 135 140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg

ES 2 736 529 T3

Tyr Pro Thr Leu Asp

305

<210> 17

<211> 930

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 17

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgatga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgcct gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacgcatt cccgtgaatc gcgcaacacg      240
cccgagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggctggtgg agtttaatga tgcgccttac      360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt      420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaac atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgcgctg gcgtagtcac      840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctccac tattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa                                     930

```

<210> 18

<211> 309

10 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 18

ES 2 736 529 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
 100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
 115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala
 130 135 140

ES 2 736 529 T3

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
145 150 155 160

Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
 165 170 175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
 180 185 190

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
 195 200 205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
 210 215 220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
225 230 235 240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
 245 250 255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
 260 265 270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
 275 280 285

Leu His Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met

ES 2 736 529 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
 100 105 110

Val Gly Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
 115 120 125

ES 2 736 529 T3

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Ser Val Cys Trp Ala
130 135 140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
145 150 155 160

Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
165 170 175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
180 185 190

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
195 200 205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
210 215 220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
225 230 235 240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
245 250 255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
260 265 270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
275 280 285

ES 2 736 529 T3

Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met

290

295

300

Asn Pro Thr Leu Asp

305

<210> 21

<211> 930

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 9

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcggtga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaatc gtccacttaa ggttctgatc      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcctcgatt cccgtgaatc gcgcagcacg      240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgcgcgtg ggcttgggtg agtttaatga tgtecgcttac      360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgatt      420
gtctgctggg cggtagagc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cactcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgcgctg gcgtagtcac      840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac aattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcact tgaatccaac gctggattaa

```

930

<210> 22

<211> 309

10 <212> PRT

<213> Escherichia coli

ES 2 736 529 T3

<400> 22

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg

1 5 10 15

Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala 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 Ser Thr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu

 100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu

ES 2 736 529 T3

115 120 125
Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Ile Val Cys Trp Ala
130 135 140
Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
145 150 155 160
Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
165 170 175
Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
180 185 190
Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
195 200 205
Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
210 215 220
Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
225 230 235 240
Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
245 250 255
Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
260 265 270

ES 2 736 529 T3

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp

275

280

285

Leu Asn Asn Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Leu

290

295

300

Asn Pro Thr Leu Asp

305

<210> 23

<211> 32

<212> ADN

5 <213> pKD3

<220>

<223> cebador para integración de metA

<400> 23 TTTCCGAAAC GTACCTCAGC AGgtgtaggc tggagctgct tc,

<210> 24

10 <211> 33

<212> ADN

<213> pKD3

<220>

<223> cebador para integración de metA

15 <400> 24 GAATAAAATT TATTCACCTG CTGcatatga atatacctct tag

<210> 25

<211> 23

<212> ADN

<213> Escherichia coli

20 <220>

<223> cebador para integración de metA

<400> 25 CAGCAGGTGA ATAAATTTTA TTC,

<210> 26

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

- <223> cebador para integración de metA
- <400> 26 CGCGAATGGA AGCTGTTTCc
- <210> 27
- <211> 32
- 5 <212> ADN
- <213> Escherichia coli
- <220>
- <223> cebador para amplificación de thrA
- <400> 27 CTGGCAAAGC TTtcaaagga aaactccttc gt
- 10 <210> 28
- <211> 32
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli
- <220>
- 15 <223> cebador para amplificación de thrA
- <400> 28 AGTCGTGATA TCatgcgagt gttgaagttc gg
- <210> 29
- <211> 820
- <212> proteína
- 20 <213> Escherichia coli
- <220>
- <223> homoserina deshidrogenasa fusionada con aspartato cinasa
- <400> 29

MRVLKFGGTSVANAERFLRVADILESNARQGQVATVLSAPAKITNHLVAMIEKTI SGQDA
 LPNISDAERIFAELLTGLAAAQPGFPLAQLKTFVDQEFAQIKHVLHGISLLGQCPDSINA
 ALICRGEKMSIAIMAGVLEARGHNVTVIDPVEKLLAVGHYLESTVDIAESTRRIAASRIP
 ADHMVLMAGFTAGNEKGELVVLGRNGSDYSAAVLAACL RADCC EIWTDVDGVYTC DPRQV
 PDARLLKSMSYQEAMELSYFGAKVLHPRTITPIAQFQIPCLIKNTGNPQAPGTLIGASRD
 EDELPVKGISNLNNMAMFSVSGPGMKGMVGM AARVFAAMSRARIFVVLITQSSSEYSISF

CVPQSDCVRAERAMQEEFYLELKEGLLEPLAVTERLAIISVVGDMRTLRLGISAKFFAAL
 ARANINIVAIAQGSSESI SVVNNDDATTGVRVTHQMLFNTDQVIEVFVIGVGGVGGAL
 LEQLKRQQSWLKNKHIDLRVCGVANSKALLTNVHGLNLENWQEELAQAKEPFNLGRLIRL
 VKEYHLLNPVIVDCTSSQAVADQYADFLREGFHVVT PNKKANTSSMDYYHQLRYAAEKSR
 RKFLYDTNVGAGLPVIENLQNLNAGDELMKFSGILSGSLSYIFGKLDEGMSFSEATTLA
 REMGYTEPDPRDDLSGMDVARKLLILARETGRELELADIEIEPVLPAEFNAEGDVAAFMA
 NLSQLDDLFAARVAKARDEGKVLRYVGNIDEDGVCRVKIAEVDGNDPLFKVKNGENALAF
 YSHYYQPLPLVLRGYGAGNDVTAAGVFADLLRRLSWKLGV

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CJ Corporation
- <120>
- 5 <160>
- <170>
- <210> 1
- <211> 71
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador para amplificación de cloranfenicol
- <400> 1
- TTACTCTGGT GCCTGACATT TCACCGACA AAGCCCAGGG AACTTCATCA Cgtgtaggct ggagctgct c
- 15 <210> 2
- <211> 71
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> cebador para amplificación de cloranfenicol
- <400> 2
- TTACCCCTTG TTTGCAGCCC GGAAGCCATT TTCCAGGTCG GCAATTAA Tcatatgaat atcctcctta g
- <210> 3
- <211> 72
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador para amplificación de kanamicina
- <400> 3
- 30 AAAGAATATG CCGATCGGTT CGGGCTTAGG CTCCAGTGC CTGTTCGGTG Ggtgtaggct ggagctgct tc
- <210> 4
- <211> 74
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>

ES 2 736 529 T3

<223> cebador para amplificación de kanamicina

<400> 4
AGACAACCGA CATCGCTTTC AACATTGGCG ACCGGAGCC GGGAAGGCA AAcatatga atatcctcc ttag

5 <210> 5
<211> 71
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador para amplificación de cloranfenicol

10 <400> 5
atggctgaat ggagcggcga atatcagc ccatagctg agcacggcaa ggtgtaggct ggagctgctt

c

<210> 6
<211> 65
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador para amplificación de cloranfenicol

<400> 6 gtattccac gtctccgggt taatcccat ctcacgatg atctccatg gaatcctc ctag

<210> 7
<211> 19
<212> ADN
20 <213> Escherichia coli

<220>
<223> cebador para amplificación de metJ

25 <400> 7 gggctttgtc ggtgaaatg

<210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Escherichia coli

30 <220>
<223> cebador para amplificación de metJ

<400> 8 actttgcat gagcgagag

<210> 9
<211> 70
35 <212> ADN
<213> ADN artificial

<220>
<223> cebador para delección de metA

<400> 9 CAATTTCTTGCGTGAAGAAAACGTCTTTGTGATGACAACTTCTCGTGCGTgtgtaggctggagctgcttc

40 <210> 10
<211> 70
<212> ADN
<213> ADN artificial

<220>
45 <223> cebador para delección de metA

<400> 10 AATCCAGCGTTGGATTCATGTGCCGTAGATCGTATGGCGTGATCTGGTAGcatatgaatcctccttag

ES 2 736 529 T3

<210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <220>
 <223> cebador para amplificación de metA

<400> 11 aatggatccT GCCGTGAGCG GCGAATAC

10 <210> 12
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<220>
 <223> cebador para amplificación de metA

<400> 12 agctctagaC TGCTGAGGTA CGTTTCGG

15 <210> 13
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 13

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcggtga agaaaacgtc 60
 tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccgcttaa ggttctgac 120
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacgcatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgtcgcttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420
 gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaacaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggetgcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660
 20 ctgtagcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg 780
 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accggatcac gccatacgat 900
 ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa 930

<210> 14
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

25

ES 2 736 529 T3

<400> 14

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala
130 135 140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
145 150 155 160

Thr Glu Gln Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
165 170 175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
180 185 190

ES 2 736 529 T3

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 Leu Ala Ser
 210 215 220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
 225 230 235 240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
 245 250 255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
 260 265 270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
 275 280 285

Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Arg Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met
 290 295 300

Asn Pro Thr Leu Asp
 305

<210> 15

<211> 930

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 15

ES 2 736 529 T3

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcggtga agaaaacgtc 60
 tttgtgatgt caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgac 120
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgogcct gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgatt ctctggaatc gcgcaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctgggtg agtttaatga tgctgcttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420
 gtctgctggg cggtagcaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660
 ctgtttgccg gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg 780
 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagagagctg gcgtagtcac 840
 ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcgc gccatacgat 900
 ctacggcaca tgtatccaac gctggattaa 930

<210> 16
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 16

5

ES 2 736 529 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
 100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
 115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala
 130 135 140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
 145 150 155 160

Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
 165 170 175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
 180 185 190

ES 2 736 529 T3

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
 195 200 205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
 210 215 220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
 225 230 235 240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
 245 250 255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
 260 265 270

Pro Arg Glu Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
 275 280 285

Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Ala Pro Tyr Asp Leu Arg His Met
 290 295 300

Tyr Pro Thr Leu Asp
 305

<210> 17

<211> 930

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 17

ES 2 736 529 T3

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

<210> 18
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 18

5

ES 2 736 529 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala
130 135 140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
145 150 155 160

Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
165 170 175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
180 185 190

ES 2 736 529 T3

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
 195 200 205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
 210 215 220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
 225 230 235 240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
 245 250 255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
 260 265 270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
 275 280 285

Leu His Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met
 290 295 300

Asn Pro Thr Leu Asp
 305

- <210> 19
- <211> 930
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

5

<400> 19
 atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcgtga agaaaacgtc 60
 tttgtgatga caacttctcg tgcgcctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc 120
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgcct gctttcaaac 180
 tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240
 cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300
 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg ggtttaatga tgtcgcttac 360
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgtct 420
 gtctgctggg cggtagagc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480
 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660
 ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720

ES 2 736 529 T3

caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagccg gactagacc ggatgtaccg 780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat 900
ctacggcaca tgaacccaac gctggattaa 930

<210> 20

<211> 309

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 20

ES 2 736 529 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
 100 105 110

Val Gly Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
 115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Ser Val Cys Trp Ala
 130 135 140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
 145 150 155 160

Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
 165 170 175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
 180 185 190

ES 2 736 529 T3

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
195 200 205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
210 215 220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
225 230 235 240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
245 250 255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
260 265 270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
275 280 285

Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met
290 295 300

Asn Pro Thr Leu Asp
305

<210> 21

<211> 930

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 9

ES 2 736 529 T3

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgcggtga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgacg      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgocgct gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctggtg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcagcacg      240
cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgtcgcttac      360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgatt      420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cactcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgccg gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac      840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac aattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcact tgaatccaac gctggattaa                                     930

```

```

<210> 22
<211> 309
5 <212> PRT
  <213> Escherichia coli
<400> 22

```

ES 2 736 529 T3

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
 100 105 110

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 Ile Val Cys Trp Ala
 130 135 140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
 145 150 155 160

Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
 165 170 175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
 180 185 190

ES 2 736 529 T3

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
 195 200 205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
 210 215 220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
 225 230 235 240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
 245 250 255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
 260 265 270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
 275 280 285

Leu Asn Asn Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Leu
 290 295 300

Asn Pro Thr Leu Asp
 305

5 <210> 23
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> pKD3

<220>
 <223> cebador para integración de metA

<400> 23 TTTCCGAAAC GTACCTCAGC AGgtgtaggc tggagctgct tc ,

10 <210> 24
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> pKD3

<220>
 <223> cebador para integración de metA

15 <400> 24 GAATAAAATT TATTCACCTG CTGcatatga atatcctct tag

<210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

20 <220>
 <223> cebador para integración de metA

<400> 25 CAGCAGGTGA ATAAATTTTA TTC ,

<210> 26
 <211> 20

- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

- <220>
- <223> cebador para integración de metA

- 5 <400> 26 CGCGAATGGA AGCTGTTTCc

- <210> 27
- <211> 32
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

- 10 <220>
- <223> cebador para amplificación de thrA

- <400> 27 CTGGCAAAGC TTcaaagga aaactccttc gt

- <210> 28
- <211> 32
- 15 <212> ADN
- <213> Escherichia coli

- <220>
- <223> cebador para amplificación de thrA

- <400> 28 AGTCGTGATA TCatgcgagt gttgaagttc gg

- 20 <210> 29
- <211> 820
- <212> proteína
- <213> Escherichia coli

- <220>
- 25 <223> homoserina deshidrogenasa fusionada con aspartato cinasa

- <400> 29

MRVLKFGGTSVANAERFLRVADILESNAHQGVATVLSAPAKITNHLVAMIEKTIISGQDALPNI SDAERIFAE LLTGLAAAQPGFPLAQLKTFVDQEF AQIKHVLHGISLLGQCPDSINALICRGEKMSIAIMAGVLEARGHNVTVIDPVEKLLAVGHYLESTVDIAESTRRIAASRIPADHMVLMAGFTAGNEKGELVVLGRNGSDY SAAVLAACLRADCC EIWTDVDGVYTC DPRQVPDARLLKSMSYQEAMELSYFGAKVLHPRTITPIAQFQIPCLIKNTGNPQAPGTLIGASRDEDELPVKGISNLNNMAMFSVSGPGMKGMVGM AARVFAAMSRARIFVVLITQSSSEYSISFCVPQSDCVRAERAMQEEFYLELKEGLLEPLAVTERLAIISVVGDMRTL RGISAKFFAALARANINIVAIAOQSSERSISVVVNDDATTGVRVTHQMLFNTDQVIEVFVIGVGGVGGALLEQLKRQOSWLKKNKHLRVCGVANSKALLTNVHGLNLENWQEELAQAKEPFNLGRLIRLVKEYHLLNPVIVDCTSSQAVADQYADFLREGFHVVTPNKKANTSSMDYYHQLRYAAEKSRKFLYDTNVGAGLPVIENLQNLNAGDELMKFSGILSGSLSYIFGKLDEGMSFSEATTLAREMGYTEPDRDDL SGM DVARKLLILARETGRELELADIEIEPVLPAEFNAEGDVAAFMANLSQLDDDLFAARVAKARDEGKVLRYVGNIDEDGVCRVKIAEVDGNDPLFKVKNGENALAFYSHYYQPLPLVLRGYGAGNDVTAAGVFADLLRRLSWKLG V

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo para producir O-succinilhomoserina, comprendiendo dicho microorganismo:
 - (i) una homoserina O-succiniltransferasa resistente a la inhibición por retroalimentación de metionina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20 o 22;
 - 5 (ii) una actividad aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa (EC2.7.2.4 o 1.1.1.3) incrementada basada en la de una proteína natural; y
 - (iii) una actividad de cistationina gamma sintasa reducida o inactivada basada en la de una proteína natural.
- 10 2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido aspartocinasa u homoserina deshidrogenasa tiene la secuencia de SEQ ID NO: 29.
3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad intracelular de homoserina cinasa se reduce o inactiva en base a la de una proteína natural.
4. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Escherichia sp.* o *Corynebacteria sp.*
- 15 5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.
6. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el microorganismo es *Corynebacteria sp.*
7. Un procedimiento de producción de O-succinilhomoserina, comprendiendo el procedimiento:
 - a) cultivar los microorganismos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un medio;
 - b) acumular la O-succinilhomoserina en el medio o en los microorganismos; y
 - 20 c) aislar la O-succinilhomoserina del medio o en los microorganismos.

Figura 1

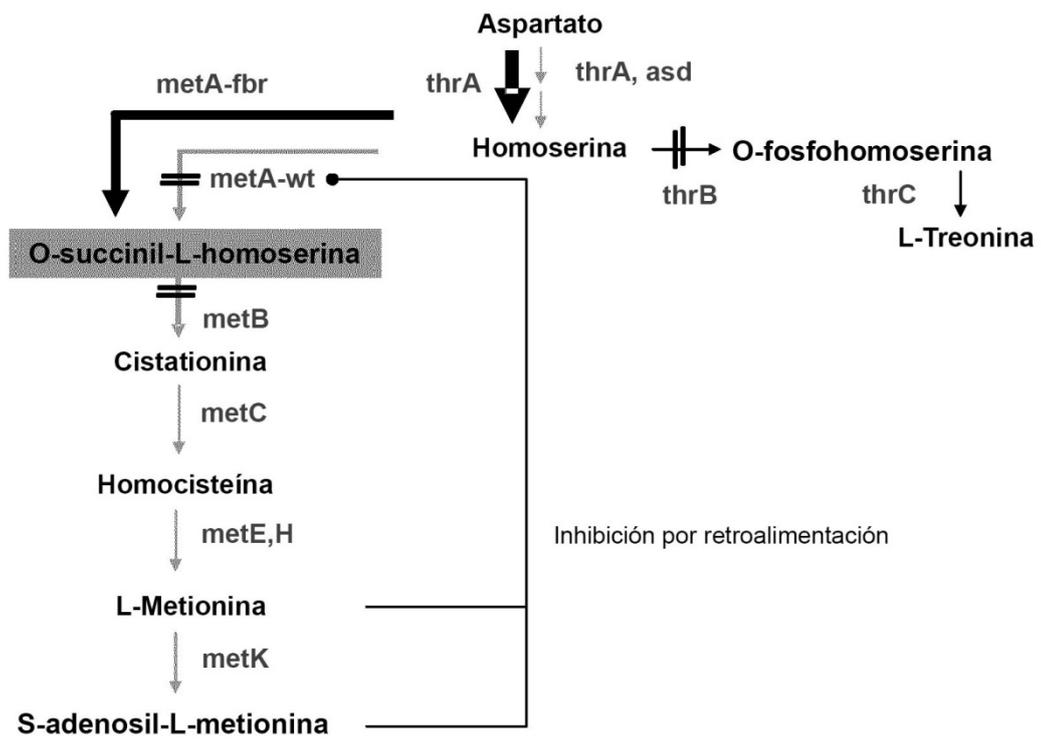


Figura 2

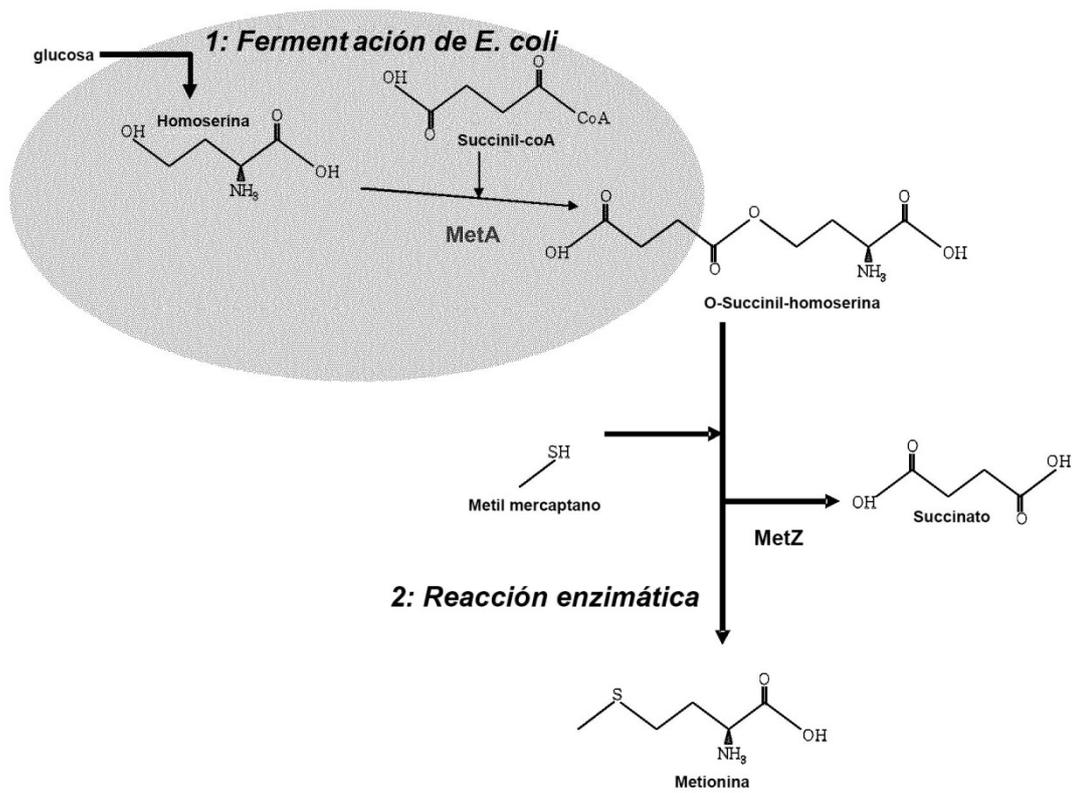


Figura 3

