

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 833 432**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12P 13/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2015 PCT/KR2015/006307**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15199396**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2015 E 15805095 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 2998388**

54 Título: **Microorganismo que produce O-acetil homoserina y método para producir O-acetil homoserina mediante el uso del microorganismo**

30 Prioridad:

**23.06.2014 KR 20140076779**

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

**15.06.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIM, HYUN AH;  
SEO, JU HEE;  
SHIN, YONG UK;  
KIM, SO YOUNG;  
KIM, SANG KYOUM;  
NA, KWANG HO;  
BAE, JEE YEON;  
SON, SUNG KWANG;  
YOO, HYE RYUN y  
CHOI, JIN GEUN**

74 Agente/Representante:

**VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester**

ES 2 833 432 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Microorganismo que produce O-acetil homoserina y método para producir O-acetil homoserina mediante el uso del microorganismo

5

### CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un microorganismo de *Escherichia* sp. que produce O-acetil homoserina, y un método para producir O-acetil homoserina con alto rendimiento mediante el uso del microorganismo.

10

### ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

La O-acetil homoserina actúa como un precursor de la metionina, que es uno de los aminoácidos esenciales en el cuerpo. La metionina se usa ampliamente como componente de soluciones de infusión médica y materias primas para productos medicinales; así como también como un alimento para animales y aditivo alimentario.

15

La metionina puede sintetizarse biológicamente o químicamente. Recientemente, se describió un proceso de dos etapas, en el que un precursor de L-metionina producido por fermentación se convierte en L-metionina mediante una reacción enzimática (publicación internacional núm. WO 2008/013432). En el proceso de dos etapas anterior, pueden usarse O-succinilhomoserina y O-acetil homoserina como el precursor de metionina, y es importante que se produzca O-acetil homoserina con alto rendimiento para la producción costo efectiva a gran escala de metionina.

20

## DESCRIPCIÓN

### Problema técnico

Los presentes inventores, mientras se esforzaban por aumentar la producción de O-acetil homoserina, descubrieron que la reducción de la expresión o actividad de la proteína citrato sintasa puede aumentar significativamente la capacidad de producción de O-acetil homoserina, lo que completa de esta manera la presente invención.

30

### Solución técnica

Un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo productor de O-acetil homoserina con una capacidad de producción aumentada de O-acetil homoserina.

35

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir O-acetil homoserina mediante el uso del microorganismo.

### Efectos Ventajosos

40

El uso del microorganismo con capacidad de producción de O-acetil homoserina de acuerdo con la presente invención puede producir O-acetil homoserina con un rendimiento mayor y de una manera más respetuosa con el medio ambiente que la síntesis química. Adicionalmente, la O-acetil homoserina así producida puede usarse como precursor para la síntesis de metionina y ácido acético por la O-acetil homoserina sulfhidrilasa, lo que permite, de esta manera la bioconversión de L-metionina, y la L-metionina así convertida puede usarse ampliamente en la producción de alimentos o aditivos alimentarios para humanos, así como también como alimentos para animales o aditivos para alimentos para animales.

45

## DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50

La Figura 1 es un diseño de un casete de expresión para la construcción de un microorganismo con una actividad atenuada de la citrato sintasa.

La Figura 2 es un mapa de restricción del vector *pBAD24*-ARN antisentido (ARNas) de la citrato sintasa.

55

## MEJOR MODO

En un aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo de *Escherichia* sp. que produce O-acetil homoserina con capacidad de producción aumentada de O-acetil homoserina en comparación con el microorganismo parental que produce O-acetil homoserina, en donde la actividad endógena de la citrato sintasa se modifica para atenuarse o inactivarse en comparación con el microorganismo parental que produce O-acetil homoserina.

60

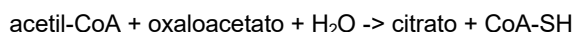
Como se usa en la presente descripción, el término "O-acetil homoserina", que es un material intermedio específico en una ruta de biosíntesis de metionina de un microorganismo, se refiere a un derivado acetilo de L-homoserina. La O-acetil homoserina puede producirse mediante una actividad enzimática de transferir un grupo acetilo del acetil-CoA a la homoserina mediante el uso de homoserina y acetil-CoA como sustratos.

65

Como se usa en la presente descripción, el término "un microorganismo que produce O-acetil homoserina" incluye un microorganismo que es un microorganismo eucariótico o procariótico que produce O-acetil homoserina dentro de un organismo vivo, y que está provisto de la capacidad de producir O-acetil homoserina respecto a su microorganismo parental sin capacidad de producción de O-acetil homoserina, o un microorganismo que está provisto endógenamente de la capacidad de producción de O-acetil homoserina.

La capacidad de producción de O-acetil homoserina puede proporcionarse o promoverse mediante la mejora de las especies. Los microorganismos que tienen la capacidad de producir O-acetil homoserina pueden incluir microorganismos pertenecientes a *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 hongos, o levaduras; específicamente, microorganismos pertenecientes a *Escherichia* sp., *Corynebacteria* sp., *Leptospira* sp. y levaduras; y más específicamente, un microorganismo perteneciente a *Escherichia* sp., como un ejemplo específico, *Escherichia coli*. Los microorganismos que tienen la capacidad de producir O-acetil homoserina pueden ser microorganismos que producen L-lisina, L-treonina, L-isoleucina, o L-metionina, o derivados de estas.

Como se usa en la presente descripción, el término "citrato sintasa (EC 2.3.3.1)" se refiere a una enzima en la primera etapa del ciclo de TCA que media la reacción entre la oxaloacetato y el acetil-CoA. Específicamente, la citrato sintasa media la reacción de condensación entre un residuo de acetato que tiene dos átomos de carbono, que está en el acetil-CoA, y el oxaloacetato que tiene cuatro átomos de carbono, y genera de esta manera un citrato que tiene seis átomos de carbono. En *Escherichia coli*, la citrato sintasa se denomina GltA, y citrato sintasa y GltA se usan indistintamente en la presente invención.



Específicamente, la citrato sintasa puede ser una derivada de *Escherichia* sp., y más específicamente, GltA derivada de *Escherichia coli*. La citrato sintasa puede ser una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 o aquellas que tienen una homología del 70 % o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, específicamente 80 % o más, o más específicamente, 90 % o más. Adicionalmente, como una secuencia que tiene una homología, si la secuencia de aminoácidos es una que tiene la misma o la actividad correspondiente de citrato sintasa con la de la SEQ ID NO: 4, es obvio que las secuencias de aminoácidos con una delección, una modificación, una sustitución, o una adición, en parte de las secuencias también deben incluirse en el alcance de la presente invención. Adicionalmente, con base en la degeneración del código genético, las secuencias polinucleotídicas que codifican la misma secuencia de aminoácidos y variantes de esta también deberían incluirse en el alcance de la presente invención.

Como se usa en la presente descripción, el término actividad "endógena" se refiere a un estado natural de una proteína en un microorganismo o un estado de actividad de la proteína correspondiente proporcionada en el microorganismo antes de la modificación.

La "atenuación o inactivación de una actividad de la proteína en comparación con su actividad endógena" se refiere a una reducción o eliminación de la actividad de la proteína cuando se compara con la que posee en su estado natural. La atenuación es un concepto que se refiere a un caso en el que la actividad de una proteína se reduce en comparación con la que originalmente poseía el microorganismo debido a una modificación en el gen que codifica la proteína, un caso en el que el nivel de expresión global de la proteína es inferior al de la cepa de tipo natural del microorganismo, o una combinación de estas. La inactivación incluye un caso en el que el gen que codifica la proteína no se expresa en absoluto en comparación con el de la cepa de tipo natural, y un caso en el que el gen se expresa, pero no muestra actividad.

La atenuación o inactivación de una actividad de la proteína puede lograrse mediante varios métodos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de los métodos pueden incluir un método para reemplazar el gen que codifica la proteína en el cromosoma con un gen mutado de manera que la actividad enzimática pueda reducirse, lo que incluye el caso en que se elimina la actividad de la proteína; un método para introducir una modificación en la secuencia reguladora de la expresión del gen que codifica la proteína en el cromosoma; un método para reemplazar la secuencia reguladora de la expresión del gen que codifica la proteína con una secuencia que tiene una actividad débil o ninguna actividad; un método para eliminar una parte o el gen completo que codifica la proteína en el cromosoma; un método para introducir un oligonucleótido antisentido (por ejemplo, ARN antisentido), que inhibe la traducción del ARNm a una proteína mediante una unión complementaria al transcrito del gen en el cromosoma; un método para hacer imposible la unión del ribosoma mediante la formación de una estructura secundaria mediante la adición artificialmente de una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) y de su secuencia complementaria en el extremo frontal de la secuencia SD del gen que codifica la proteína; un método de ingeniería de transcripción inversa (RTE), que adiciona un promotor de manera que se transcriba inversamente en el extremo 3' del marco de lectura abierto (ORF) de la secuencia correspondiente, etc., e incluye también una combinación de estos.

Específicamente, el método para eliminar una parte o el gen completo que codifica una proteína puede realizarse

mediante el reemplazo del polinucleótido, que codifica la proteína diana endógena dentro del cromosoma mediante un vector para insertar al cromosoma en un microorganismo, un polinucleótido o un marcador donde se elimina parte de la secuencia polinucleotídica. Por ejemplo, puede usarse un método de delección de genes mediante recombinación homóloga. Adicionalmente, como se usa en la presente descripción, el término "parte", aunque puede variar en dependencia de los tipos de polinucleótidos, puede referirse específicamente a de 1 nucleótido a 300 nucleótidos, más específicamente de 1 nucleótido a 100 nucleótidos, e incluso más específicamente de 1 nucleótido a 50 nucleótidos.

Adicionalmente, el método de modificación de la secuencia reguladora de la expresión puede realizarse mediante la inducción de una variación en la secuencia reguladora de la expresión de la secuencia polinucleotídica mediante delección, inserción, sustitución conservadora, sustitución no conservadora, o una combinación de estas para atenuar aún más la actividad de la secuencia reguladora de la expresión; o mediante el reemplazo de la secuencia polinucleotídica con una secuencia polinucleotídica que tenga una actividad más débil. La secuencia polinucleotídica puede incluir un promotor, una secuencia de operador, una secuencia que codifica un dominio de unión al ribosoma, y una secuencia para regular la terminación de la transcripción y la traducción.

Adicionalmente, el método de modificación de la secuencia génica en el cromosoma puede realizarse mediante la inducción de una variación en la secuencia mediante delección, inserción, sustitución conservadora, sustitución no conservadora, o una combinación de estas para atenuar aún más la actividad de la secuencia reguladora de la expresión; o mediante el reemplazo de la secuencia con una secuencia génica mejorada que tenga una actividad más débil o una secuencia génica mejorada que no tenga actividad.

Específicamente, para la atenuación de la actividad de la proteína citrato sintasa, parte de un(os) aminoácido(s) en la secuencia de aminoácidos de la proteína citrato sintasa puede sustituirse por otro(s) aminoácido(s). Más específicamente, puede incluirse un citrato sintasa que tiene una secuencia de aminoácidos, en la que el 145° aminoácido o el 167° aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la proteína citrato sintasa se sustituye de tirosina (Y) o lisina (K) a otro(s) aminoácido(s). Aún más específicamente, la citrato sintasa puede ser una que tenga una secuencia génica que codifica un polipéptido modificado, en el que el 145° aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la proteína citrato sintasa se sustituye de tirosina (Y) a alanina (A), y el 167° aminoácido se sustituye de lisina (K) a alanina (A). En particular, el número de residuos de aminoácidos se determinó en orden secuencial después de establecer el aminoácido posicionado próximo a la metionina, que se codifica por el codón de iniciación, como el 1<sup>er</sup> aminoácido. El polipéptido puede tener respectivamente una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o 2. Adicionalmente, si la actividad de la citrato sintasa es más débil que la de un tipo silvestre, la citrato sintasa puede incluir secuencias de aminoácidos que tengan una homología del 80 % o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2, específicamente 90 % o más, más específicamente 95 % o más, e incluso más específicamente 97 % o más. Como una secuencia que tiene una homología, si la secuencia de aminoácidos es una que tiene sustancialmente la misma o la actividad biológica correspondiente de una proteína de la SEQ ID NO: 1 o 2, es obvio que las secuencias de aminoácidos con una delección, una modificación, una sustitución o una adición en parte de las secuencias también debe incluirse en el alcance de la presente invención.

Como se usa en la presente descripción, el término "homología" se refiere a un porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o restos polipeptídicos. La homología entre secuencias de un resto a otro resto puede determinarse mediante una tecnología conocida en la técnica. Por ejemplo, la homología puede determinarse mediante el ordenamiento directo de la información de secuencia entre dos moléculas polinucleotídicas diferentes o dos polipéptidos diferentes mediante el uso de un programa informático que ordena y obtiene fácilmente la información de secuencia. El programa informático puede incluir BLAST (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR Inc.), etc. Adicionalmente, la homología entre polinucleótidos puede determinarse mediante la hibridación de los polinucleótidos bajo la condición de formar una doble hebra estable entre regiones homólogas, la descomposición con una nucleasa específica de una cadena simple, y la determinación de los fragmentos descompuestos.

Como se usa en la presente descripción, el término "homología" se refiere a una relación entre proteínas que tienen un "origen evolutivo común" que incluyen proteínas homólogas derivadas de proteínas de una superfamilia en todas las formas gramaticales o con variaciones de ortografía, y aquellas derivadas de diferentes especies. Estas proteínas (y los genes que las codifican) tienen homologías de secuencia reflejadas por altos niveles de similitudes de secuencia. Sin embargo, el término "homología", para su uso general y el uso en la presente invención, se referiría a una similitud de secuencia cuando se modifica con un adjetivo tal como "muy alta", en lugar de referirse a un origen evolutivo común.

En una modalidad ejemplar de la presente invención, el microorganismo puede ser uno en el que la actividad de la cistationina gamma sintasa (EC 2.5.1.48), de la homoserina quinasa (EC 2.7.1.39), o las actividades de ambas se modifican adicionalmente para atenuarse o inactivarse en comparación con sus actividades endógenas.

Como se usa en la presente descripción, el término "cistationina gamma sintasa" se refiere a una enzima que puede sintetizar cistationina mediante una reacción química que se describe más abajo, mediante el uso de O-succinilhomoserina y L-cisteína como sustratos. En la presente invención, la cistationina gamma sintasa de *E. coli* se designa como "MetB".

## O-succinil-L-homoserina + L-cisteína -&gt; L-cistationina + succinato

Específicamente, la cistationina gamma sintasa de *E. coli* puede ser una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9 o aquellas que tienen una homología del 70 % o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, específicamente 80 % o más, y más específicamente 90 % o más. Adicionalmente, como una secuencia que tiene una homología, si la secuencia de aminoácidos es una que tiene la misma o la actividad correspondiente de la homoserina quinasa con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, es obvio que las secuencias de aminoácidos con una delección, una modificación, una sustitución, o una adición en parte de las secuencias también deben incluirse en el alcance de la presente invención. Adicionalmente, con base en la degeneración del código genético, las secuencias polinucleotídicas que codifican la misma secuencia de aminoácidos y variantes de esta también deberían incluirse en el alcance de la presente invención.

El método para modificar la atenuación o inactivación de la actividad cistationina gamma sintasa puede realizarse de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Como se usa en la presente descripción, el término "homoserina quinasa" se refiere a una enzima que causa la fosforilación de la homoserina, que realiza la reacción química descrita más abajo. En la presente invención, la homoserina quinasa de *E. coli* se designa como "ThrB".

## ATP + L-homoserina -&gt; ADP + O-fosfo-L-homoserina

Específicamente, la homoserina quinasa de *Escherichia* sp. puede ser una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11 o aquellas que tienen una homología del 70 % o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, específicamente 80 % o más, o más específicamente, 90 % o más. Adicionalmente, como una secuencia que tiene una homología, si la secuencia de aminoácidos es una que tiene la misma o la actividad correspondiente de homoserina quinasa con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, es obvio que las secuencias de aminoácidos con una delección, una modificación, una sustitución, o una adición en parte de las secuencias también deben incluirse en el alcance de la presente invención. Adicionalmente, con base en la degeneración del código genético, las secuencias polinucleotídicas que codifican la misma secuencia de aminoácidos y variantes de esta también deberían incluirse en el alcance de la presente invención.

El método para modificar la atenuación o inactivación de la actividad de la homoserina quinasa puede realizarse de acuerdo con el método descrito anteriormente.

En un aspecto específico de la presente invención, el microorganismo puede ser uno, en donde la actividad de la homoserina O-acetiltransferasa se modifica adicionalmente para introducirla o mejorarla, o la homoserina O-succiniltransferasa endógena se modifica adicionalmente para que tenga la actividad de la homoserina O-acetiltransferasa.

Como se usa en la presente descripción, el término "homoserina O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.31)" se refiere a una enzima que tiene la actividad de transferir un grupo acetilo del acetil-CoA a la homoserina.

Específicamente, el microorganismo de acuerdo con la presente invención puede introducirse con la actividad de la homoserina O-acetiltransferasa. La homoserina O-acetiltransferasa puede derivarse de diversas especies de microorganismos, por ejemplo, de un microorganismo seleccionado entre *Corynebacteria* sp., *Leptospira* sp., *Deinococcus* sp., *Deinococcus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Mycobacterium* sp. Específicamente, la homoserina O-acetiltransferasa pueden ser aquellas que incluyen las secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO: 13 (*Leptospira meyeri*), SEQ ID NO: 14 (*Corynebacterium glutamicum*), o SEQ ID NO: 15 (*Deinococcus radiodurans*). Adicionalmente, la homoserina O-acetiltransferasa puede ser una proteína que comprende las secuencias de aminoácidos anteriores o aquellas que tienen una homología del 70 % o más con las secuencias de aminoácidos anteriores, específicamente el 80 % o más, o más específicamente, el 90 % o más. Adicionalmente, con base en la degeneración del código genético, las secuencias polinucleotídicas que codifican la misma secuencia de aminoácidos y variantes de esta también deberían incluirse en el alcance de la presente invención.

En la publicación de solicitud de patente coreana núm. 10-2011-0023703 y en la publicación de solicitud de patente europea núm. EP 2290051 se describen ejemplos de homoserina O-acetiltransferasa que se van a usar en la presente invención.

Adicionalmente, la proteína, en la que la homoserina O-succiniltransferasa endógena (EC 2.3.1.46) se modifica para que tenga la actividad de homoserina O-acetiltransferasa, se refiere a un polipéptido, en el que la especificidad de sustrato del polipéptido que tiene la actividad homoserina O-succiniltransferasa cambia de succinil-CoA a acetil-CoA. Adicionalmente, la proteína modificada puede ser un polipéptido que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa, a diferencia de su tipo silvestre, mediante el reemplazo de parte de la secuencia de aminoácidos del polipéptido que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa.

Ejemplos de homoserina O-succiniltransferasa pueden ser un polipéptido de *Enterobacteria* sp., *Salmonella* sp.,

*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. o *Escherichia* sp., Específicamente, un polipéptido de *Escherichia* sp. que tiene la actividad homoserina O-succiniltransferasa, por ejemplo, un polipéptido que tiene actividad homoserina O-succiniltransferasa de *E. coli*. Más específicamente, la homoserina O-succiniltransferasa de *E. coli* puede tener la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16. La homoserina O-succiniltransferasa de *E. coli* se designa como "MetA".

La homoserina O-succiniltransferasa modificada puede ser un polipéptido variante, en el que el 111º aminoácido del polipéptido representado por la SEQ ID NO: 16 o polipéptidos que tienen una homología del 95 % o superior con la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 16 se sustituye con ácido glutámico, y adicionalmente, el 112º aminoácido se sustituye con treonina o histidina. Específicamente, el polipéptido variante puede ser un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 17 a 19. Adicionalmente, el polipéptido variante puede ser una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 70 % o más con la secuencia de aminoácidos anterior, específicamente del 80 % o más, o más específicamente del 90 % o más. Adicionalmente, con base en la degeneración del código genético, las secuencias polinucleotídicas que codifican la misma secuencia de aminoácidos y variantes de esta también deberían incluirse en el alcance de la presente invención. La información sobre la homoserina O-succiniltransferasa modificada puede obtenerse de la publicación de la solicitud de patente coreana núm. 10-2012-0070531 o la publicación internacional núm. WO 2012/087039.

Como se usa en la presente descripción, el término "introducción o mejora de la actividad" se refiere a proporcionar la actividad de una proteína particular a un microorganismo que no posee la proteína; o a mejorar la actividad intracelular de la proteína en el microorganismo que posee la proteína, y lo similar, y se refiere al aumento de la actividad intracelular de la proteína en comparación con la actividad endógena de la proteína.

Como se usa en la presente descripción, el término "introducción o mejora de la actividad de la proteína" se refiere no solo a la obtención de un efecto mayor que la función original debido al aumento de la actividad de la proteína en sí, sino también al aumento de la actividad de la proteína debido al aumento de la actividad génica endógena, la amplificación génica endógena por factores internos o externos, el aumento del número de copias, la introducción de genes desde el exterior, el aumento de la actividad enzimática debido a la sustitución, modificación, o mutación, etc.

En lo anterior, el aumento en el número de copias del gen puede realizarse en un estado operativamente conectado a un vector, o mediante la inserción en el cromosoma dentro de una célula huésped. Específicamente, el método puede ejecutarse mediante la introducción de un vector, al cual un polinucleótido que codifica la proteína de la presente descripción está conectado operativamente, y que puede replicarse y funcionar independientemente de un huésped, dentro de una célula del huésped; o mediante la introducción de un vector, al que el polinucleótido está conectado operativamente, insertar el polinucleótido en el cromosoma de la célula huésped, dentro de la célula huésped, lo que aumenta de esta manera el número de copias del gen dentro del cromosoma de la célula huésped.

El vector es una construcción de ADN que incluye la secuencia polinucleotídica del polinucleótido que codifica la proteína diana, que está operativamente conectada a una secuencia de regulación adecuada para que la proteína diana pueda expresarse en un huésped apropiado, en donde la secuencia de regulación incluye un promotor que inicia la transcripción, una secuencia de operador aleatoria para la regulación de la transcripción, una secuencia que codifica un dominio de unión al ribosoma de ARNm adecuado y una secuencia para la regulación de la transcripción y la traducción. El vector, después de transformarse en una célula huésped apropiada, puede replicarse o funcionar independientemente del genoma del huésped, o puede integrarse en el mismo genoma del huésped.

El vector usado en la presente invención puede no estar específicamente limitado siempre que el vector sea replicable en la célula huésped, y puede usarse cualquier vector conocido en la técnica. Los ejemplos de los vectores pueden incluir plásmidos, cósmidos, virus, y bacteriófagos naturales o recombinantes. Por ejemplo, pueden usarse como vector fago o vector cósmido, pueden usarse *pWE15*, *M13*, *λMBL3*, *λMBL4*, *λIXII*, *λASHII*, *λAPII*, *λt10*, *λt11*, *Charon4A*, *Charon21A*, etc. y como un vector plásmido, basados en *pBR*, basados en *pUC*, basados en *pBluescriptII*, basados en *pGEM*, basados en *pTZ*, basados en *PCL*, basados en *pET*, etc. Específicamente, pueden usarse vectores *pDZ*, *pACYC177*, *pACYC184*, *pCL*, *pECCG117*, *pUC19*, *pBR322*, *pMW118*, *pCC1BAC*, etc.

Adicionalmente, un polinucleótido que codifica una proteína diana endógena puede sustituirse por un polinucleótido modificado mediante el uso de un vector para insertarlo en el cromosoma de un microorganismo. La inserción del polinucleótido en el cromosoma puede realizarse mediante el uso de un método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante recombinación homóloga. Dado que el vector puede insertarse en el cromosoma mediante recombinación homóloga, puede incluirse adicionalmente un marcador de selección para la confirmación de la inserción en el cromosoma. El marcador de selección se usa para la selección de una célula transformada, es decir, para confirmar si se insertó el polinucleótido diana, y pueden usarse marcadores que proporcionan fenotipos seleccionables como resistencia a fármacos, requerimiento de nutrientes, resistencia a agentes citotóxicos, y expresión de proteínas de superficie. En las circunstancias en las que se tratan agentes selectivos, solo las células que expresan los marcadores de selección pueden sobrevivir o expresar otros rasgos fenotípicos y así las células transformadas pueden seleccionarse fácilmente.

Como se usa en la presente descripción, el término "transformación" se refiere a un proceso de introducción de un

vector que incluye un polinucleótido que codifica una proteína diana en una célula huésped, lo que permite, de esta manera, la expresión del polinucleótido codificado por la proteína en la célula huésped. Para el polinucleótido transformado, no importa si se inserta en el cromosoma de una célula huésped y se localiza dentro de este, o si se localiza fuera del cromosoma, siempre que pueda expresarse en la célula huésped. Adicionalmente, los polinucleótidos incluyen ADN y ARN, que codifican la proteína diana. El polinucleótido puede insertarse en cualquier forma siempre que pueda introducirse en una célula huésped y expresarse en ella. Por ejemplo, el polinucleótido puede introducirse en una célula huésped en forma de un casete de expresión, que es una construcción genética que incluye todos los elementos esenciales necesarios para la autoexpresión. El casete de expresión puede incluir convencionalmente un promotor conectado operativamente al polinucleótido, una señal de terminación de la transcripción, un dominio de unión al ribosoma, y una señal de terminación de la traducción, y puede estar en la forma de un vector de expresión capaz de la autorreplicación. Adicionalmente, el polinucleótido puede introducirse en una célula huésped tal como está y conectarse operativamente a una secuencia esencial para su expresión en la célula huésped. Adicionalmente, como se usa en la presente descripción, el término "conectado operativamente" se refiere a una conexión funcional entre una secuencia promotora, que inicia y media la transcripción del polinucleótido que codifica la proteína diana, y la secuencia génica.

Entonces, la modificación de la secuencia reguladora de la expresión para aumentar la expresión del polinucleótido puede realizarse mediante la inducción de una variación en la secuencia polinucleotídica mediante delección, inserción, sustitución conservadora, sustitución no conservadora, o una combinación de estas para mejorar aún más la actividad de la secuencia reguladora de la expresión; o mediante el reemplazo de la secuencia polinucleotídica con una secuencia polinucleotídica con una actividad más fuerte. La secuencia de regulación de la expresión puede incluir un promotor, una secuencia de operador, una secuencia que codifica un dominio de unión a ribosoma, y una secuencia para regular la terminación de la transcripción y de la traducción, etc. Adicionalmente, un promotor exógeno fuerte, en lugar del promotor original, puede conectarse al extremo superior de la unidad de expresión del polinucleótido.

Adicionalmente, la modificación de la secuencia polinucleotídica en el cromosoma puede realizarse mediante la inducción de una variación en la secuencia reguladora de la expresión de la secuencia polinucleotídica mediante delección, inserción, sustitución conservadora, sustitución no conservadora o una combinación de estas para mejorar aún más la actividad de la secuencia polinucleotídica; o mediante el reemplazo de la secuencia polinucleotídica con una secuencia polinucleotídica mejorada con una actividad más fuerte.

Generalmente, la introducción y mejora de la actividad de la proteína puede aumentar la actividad o concentración de la proteína correspondiente en relación con la actividad o concentración de una proteína de tipo silvestre o en un microorganismo de al menos 1 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, hasta un máximo de 1000 % o 2000 %.

Adicionalmente, el microorganismo puede ser uno en el que la actividad de la homoserina *O*-succiniltransferasa endógena se modificó para atenuarse o inactivarse en comparación con la de la actividad endógena, con el fin de mejorar la ruta de biosíntesis de la *O*-acetil homoserina mediante el bloqueo de la ruta de biosintetizar *O*-succinil homoserina a partir de homoserina.

La modificación de la atenuación o inactivación de la actividad homoserina *O*-succiniltransferasa puede realizarse de acuerdo con el método explicado anteriormente.

En una modalidad ejemplar de la presente invención, el microorganismo productor de *O*-acetil homoserina puede ser uno en el que la actividad de una enzima que participa en la ruta de biosíntesis de fosfoenolpiruvato a homoserina se modifica para introducirla o mejorarla adicionalmente, con el fin de aumentar aún más la cantidad de homoserina, un sustrato para la biosíntesis de *O*-acetil homoserina.

Específicamente, el microorganismo anterior puede ser uno en el que la actividad de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*, EC 4.1.1.31), aspartato aminotransferasa (*aspC*, EC 2.6.1.1), y aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*, EC 1.2.1.11) se modifica para introducirla o mejorarla.

Por ejemplo, el gen *ppc* que codifica fosfoenolpiruvato carboxilato que incluye una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20, gen *aspC* que codifica aspartato aminotransferasa que incluye una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21, y gen *asd* que codifica la aspartato semialdehído deshidrogenasa que incluye una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22 pueden introducirse en un microorganismo. Por ejemplo, las actividades de las tres enzimas diferentes pueden modificarse para introducirlas o mejorarlas al hacer que todos los genes que codifican las tres enzimas diferentes presentes en el cromosoma de una célula huésped tengan un número de copias de al menos 2. La introducción y mejora de las actividades puede realizarse de acuerdo con el método descrito anteriormente.

En una modalidad ejemplar de la presente invención, la actividad de la proteína citrato sintasa se modificó para atenuarla o inactivarla mediante varios métodos, que incluyen eliminar el gen de la citrato sintasa en un microorganismo de *E. coli* que produce *O*-acetil homoserina; introducir el gen que codifica la proteína citrato sintasa

modificada, cuya actividad se modificó para atenuarse en comparación con la de un tipo silvestre, en la posición del gen de la citrato sintasa; e introducir un vector de expresión para el ARN antisentido del gen de la citrato sintasa. Como resultado, el microorganismo productor de *O*-acetil homoserina así construido, en el que la actividad de la proteína citrato sintasa se modificó para ser atenuada o inactivada, mostró una capacidad mejorada de producción de *O*-acetil homoserina, en comparación con la del microorganismo parental (ejemplos del 1 al 4).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir *O*-acetil homoserina mediante el uso de un microorganismo productor de *O*-acetil homoserina con una capacidad de producción aumentada de *O*-acetil homoserina. Específicamente, la presente invención proporciona un método para producir *O*-acetil homoserina, que comprende: (a) cultivar el microorganismo de la presente invención; y (b) recuperar la *O*-acetil homoserina producida durante el cultivo del microorganismo.

El método de cultivo de *E. coli* que tiene capacidad de producción de *O*-acetil homoserina de acuerdo con la presente invención puede realizarse de acuerdo con los medios adecuados y las condiciones de cultivo conocidas en la técnica. El proceso de cultivo puede ajustarse fácilmente por un experto en la técnica en dependencia del microorganismo que se seleccione. En particular, dado que el microorganismo de la presente invención es un microorganismo donde la actividad de la citrato sintasa, que es una enzima que media la primera etapa del ciclo de los TCA, se modifica para atenuarse o inactivarse, el medio de cultivo puede incluir glutamato.

Los ejemplos de métodos de cultivo pueden incluir un cultivo discontinuo, un cultivo continuo, y un cultivo discontinuo alimentado. Estos diversos métodos se describen, por ejemplo, en "Biochemical Engineering" de James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pág. 138-176.

El medio usado en el cultivo puede cumplir apropiadamente el requerimiento de un microorganismo específico. Específicamente, se describen ejemplos de medios de cultivo de microorganismos en "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology, Washington, DC, 1981. Los medios de cultivo pueden ser aquellos que incluyen una fuente de carbono apropiada, fuente de fósforo, compuesto inorgánico, aminoácidos, y/o vitaminas, etc., y el cultivo puede realizarse en condiciones aeróbicas mientras se ajusta la temperatura, pH, etc.

Los ejemplos de las fuentes de carbono pueden incluir carbohidratos tales como glucosa, lactosa, sacarosa, ácido láctico, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino, aceite de argán y aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estas fuentes de carbono pueden usarse solas o en combinación.

Los ejemplos de la fuente de nitrógeno pueden incluir fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, salsa de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz (CSL), y harina de frijoles; y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o en combinación. Como una fuente de fósforo, los medios de cultivo pueden contener, además, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio y las correspondientes sales que contienen sodio. Los medios de cultivo pueden incluir metales tales como sulfato de magnesio y sulfato de hierro. Adicionalmente, pueden incluirse aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Estos medios de cultivo o precursores pueden añadirse al cultivo en forma de cultivo en lotes o cultivo continuo.

Adicionalmente, el pH del cultivo puede ajustarse mediante la adición de un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico, y ácido sulfúrico durante el cultivo de una manera apropiada. Adicionalmente, la formación de burbujas puede prevenirse durante el cultivo mediante el uso de un agente antiespumante tal como éster de políglicol de ácido graso. Adicionalmente, para mantener las condiciones aeróbicas en un líquido de cultivo, puede añadirse a un cultivo un gas oxígeno o un gas (por ejemplo, aire) que contenga un gas oxígeno. La temperatura de cultivo puede ser de 20 °C a 45 °C y específicamente de 25 °C a 40 °C. El cultivo puede continuarse hasta que la producción de *O*-acetil homoserina alcance el nivel deseado, y específicamente de 10 horas a 160 horas.

El método para producir *O*-acetil homoserina de la presente invención puede incluir, además, recuperar *O*-acetil homoserina del microorganismo cultivado o un producto cultivado de este. La recuperación de la *O*-acetil homoserina deseada puede realizarse mediante un método de cultivo de microorganismos, por ejemplo, un método apropiado conocido en la técnica tal como un cultivo discontinuo, un cultivo continuo, y un cultivo discontinuo alimentado.

La recuperación puede incluir una etapa de purificación.

La *O*-acetil homoserina así recuperada puede producir metionina mediante un proceso de dos etapas (patente coreana núm. 10-0905381).

El proceso de dos etapas incluye un proceso de producción de L-metionina y un ácido orgánico mediante una reacción enzimática mediante el uso de una enzima que tiene la actividad *O*-acetil homoserina sulfhidrilasa o un microorganismo que posee la enzima, mientras se usa la *O*-acetil homoserina, que se produjo por el microorganismo productor del

precursor de L-metionina, y metilmercaptano como sustratos.

Más específicamente, además, se describe en la presente descripción un método para producir L-metionina mediante una reacción enzimática de la O-acetil homoserina sulfhidrilasa, etc., mediante el uso de la O-acetil homoserina, que se acumuló mediante el método anterior, como sustrato.

En la segunda etapa, cuando se usa la O-acetil homoserina como precursor de la L-metionina, puede usarse la O-acetil homoserina sulfhidrilasa derivada de un microorganismo, específicamente perteneciente a *Leptospira* sp., *Chromobacterium* sp., y *Hyphomonas* sp., y más específicamente perteneciente a *Leptospira meyeri*, *Pseudomonas aurogenosa*, *Hyphomonas Neptunium* y *Chromobacterium Violaceum*.

La reacción es la misma que se muestra más abajo.



El proceso adicional para producir metionina se describe en la patente coreana núm. 10-0905381.

### MODO PARA LA INVENCIÓN

En lo adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos, y la invención no pretende limitarse por estos ejemplos.

#### Ejemplo de referencia: construcción de microorganismos productores de O-acetil homoserina

##### **<1-1> Delección del gen *metB* derivado de *E. coli* de tipo silvestre (publicación internacional núm. WO 2008/013432)**

Se construyó un microorganismo productor de O-acetil homoserina mediante el uso de *E. coli*, un microorganismo representativo entre *Escherichia* sp. Con este fin, se usó *E. coli* K12 *W3110* de tipo silvestre (ATCC27325) obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Primero, con el fin de bloquear la ruta de síntesis de la O-succinil-L-homoserina a cistationina, se eliminó el gen *metB* que codifica la cistationina sintasa (SEQ ID NO: 10). Específicamente, la cistationina sintasa que codifica el gen *metB* se eliminó mediante un método de delección por PCR de una etapa FRT (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645).

Específicamente, el casete de delección de *metB* se construyó mediante una reacción de PCR basada en el vector *pKD3* (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645) como molde mediante el uso de cebadores de las SEQ ID NO: 30 y 31 de la siguiente manera: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto. El producto de PCR resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 % y se purificó una banda de ADN de 1,2 kb obtenida a partir del mismo. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en *E. coli* (K12) *W3110*, transformada antes con el vector *pKD46* (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645). Para la electroporación, la cepa *W3110* transformada con el *pKD46* se cultivó en un medio LB que contenía 100 µg/L de ampicilina y 5 mM de arabinosa (L-arabinosa) a 30 °C hasta una DO<sub>600</sub> = 0,6 y se usó después de lavar dos veces con agua destilada estéril y una vez con glicerol al 10 %. La electroporación se realizó a 2500 V. La cepa recuperada se sembró en estrías en una placa LB que contenía 25 µg/L de cloranfenicol, se cultivó a 37 °C durante la noche, y se seleccionó la cepa que mostraba resistencia. La cepa seleccionada se sometió a una reacción de PCR en las mismas condiciones basadas en la cepa como molde mediante el uso de los mismos cebadores, y se confirmó la delección del gen *metB* mediante la observación del tamaño del gen de 1,2 kb en un gel de agarosa al 1,0 %. La cepa así confirmada se cultivó en un medio LB después de volver a transformarla con el vector *pCP20* (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645), y se construyó la cepa final con el gen *metB* eliminado, donde el tamaño del gen se redujo a 150 pb en un gel de agarosa al 1,0 % mediante PCR realizada en las mismas condiciones, y se confirmó la eliminación del marcador de cloranfenicol. La cepa así construida se denominó "W3-B".

##### **<1-2> Delección del gen *thrB* (publicación internacional núm. WO 2008/013432)**

En un esfuerzo por aumentar la cantidad de síntesis de O-succinilhomoserina a partir de homoserina, se eliminó el gen *thrB*, que es un gen que codifica la homoserina quinasa. Para la delección del gen *thrB* de la cepa *W3-B* construida en el Ejemplo 1, se usó el método de delección por PCR de una etapa FRT usado en la delección del gen *metB*.

Se construyó un casete de delección de *thrB* mediante PCR basado en el vector *pKD4* (PNAS (2000) vol. 97: P6640-6645) como molde mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 32 y 33 de la siguiente manera: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto.

El producto de PCR resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 % y se purificó una banda de ADN de 1,6 kb obtenida a partir del mismo. El fragmento de ADN recuperado se sometió a electroporación en la cepa *W3-B*, transformada antes con el vector *pKD46*. La cepa recuperada se sembró en estrías en una placa LB que

contenía 50 µg/L de kanamicina, se cultivó a 37 °C durante la noche, y se seleccionó la cepa que mostraba resistencia.

La cepa seleccionada se sometió a una reacción de PCR en las mismas condiciones basado directamente en la cepa como molde mediante el uso de los mismos cebadores de las SEQ ID NO: 32 y 33, y se confirmó la delección del gen *thrB* mediante la selección de la cepa que tenía el tamaño del gen de 1,6 kb en un gel de agarosa al 1,0 %. La cepa así confirmada se cultivó en un medio LB después de transformarla nuevamente con el vector *pCP20*, y se construyó la cepa final con el gen *thrB* eliminado, donde el tamaño del gen se redujo a 150 pb en un gel de agarosa al 1,0 % mediante PCR realizada en las mismas condiciones, y se confirmó la eliminación del marcador de kanamicina. La cepa así construida se denominó "W3-BT".

### <1-3> Una variante de *metA* con actividad homoserina acetiltransferasa (publicación internacional núm. WO 2012/087039)

Con el fin de reforzar la actividad de la homoserina acetiltransferasa en la cepa obtenida en el Ejemplo de referencia <1-2>, se pretendía introducir el gen *metA* de tipo mutante (SEQ ID NO: 24 y 26) que codifica la homoserina acetiltransferasa.

En primer lugar, para construir la variante del gen *metA* con una actividad reforzada, se realizó una reacción de PCR basada en el cromosoma de una cepa de tipo silvestre W3110 como molde mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 34 y 35, y se amplificó el gen *metA* que codifica la homoserina O-succiniltransferasa.

Los cebadores usados en la reacción de PCR se prepararon en base a la secuencia polinucleotídica del cromosoma de *E. coli*, NC\_000913, registrada en el NIH Gene Bank, y los cebadores de las SEQ ID NO: 34 y 35 tienen los sitios de restricción *EcoRV* y *Hind III*, respectivamente. El producto de PCR así obtenido y el plásmido *pCL1920* que incluye *Pcj1* se trataron respectivamente con *EcoRV* y *Hind III*, y el producto de PCR se clonó en el plásmido *pCL1920*. *E. coli* DH5α se transformó mediante el uso del plásmido clonado, y la *E. coli* DH5α transformada se seleccionó en placas LB que contenían 50 µg/ml de espectinomicina, y se obtuvo el plásmido de las mismas. El plásmido así obtenido se denominó "*pCL\_Pcj1\_metA*".

A continuación, el 111º aminoácido, glicina (Gly), de la O-succiniltransferasa se sustituyó con ácido glutámico (Glu) (G111E) basado en el plásmido *pCL\_Pcj1\_metA* construido anteriormente como un molde mediante el uso de un kit de mutagénesis sitio dirigida (Stratagene, EE.UU.). El plásmido así construido que incluye la variante del gen *metA* de G111E se denominó "*pCL\_Pcj1\_metA* (EL)".

Adicionalmente, con el fin de sustituir el 111º aminoácido de la O-succiniltransferasa de glicina a ácido glutámico, y el 112º aminoácido de leucina a histidina, se usaron los cebadores de las SEQ ID NO: 38 y 39. El plásmido que incluye el gen *metA*, en el que el 111º aminoácido se sustituyó de glicina a ácido glutámico, y el 112º aminoácido se sustituyó de leucina a histidina se designó como "*pCL\_Pcj1\_metA* (EH)".

Después, se construyó un casete de reemplazo, para el reemplazo con *metA* (EH) en una cepa, mediante PCR mediante el uso del vector *pKD3* como molde junto con los cebadores de las SEQ ID NO: 40 y 41 de la siguiente manera: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 2 minutos. El producto de PCR respectivo se obtuvo mediante el uso de *pCL\_Pcj1\_metA* (EH) como molde para la parte *metA* (EH) del casete de reemplazo junto con los cebadores de las SEQ ID NO: 42 y 43, y los cebadores de las SEQ ID NO: 42 y 45 para la parte *metA* de tipo silvestre. Se construyeron casetes de reemplazo de *metA* (EH), que incluyen la parte del marcador de cloranfenicol, mediante el uso de los tres productos de PCR diferentes junto con los cebadores de las SEQ ID NO: 42 y 45, y se electroporaron en la cepa W3-BT, transformada antes con el vector *pKD46*, construido en el Ejemplo de referencia <1-2>. La cepa así confirmada se cultivó en un medio LB después de transformarse de nuevo con el vector *pCP20*, y la cepa en la que se eliminó el marcador de cloranfenicol y el gen *metA* se sustituyó por *metA* (EH) se denominó "W3-BTA".

### <1-4> Construcción de una cepa con 2 copias de los genes *ppc*, *aspC*, y *asd* (publicación de solicitud de patente europea núm. EP 2290051)

Con el fin de aumentar la capacidad de producción de O-acetil homoserina de la cepa W3-BTA construida en el Ejemplo de referencia <1-3>, la ruta biosintética se mejoró al citar la patente presentada anteriormente núm. EP 2290051. De la misma manera que en la patente EP anterior, se construyó una cepa que tiene 2 copias amplificadas de cada uno de los genes, es decir, el gen *ppc* que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa mediante el uso de cebadores de las SEQ ID NO: 46, 47, 48 y 49; gen *aspC* que codifica la aspartato aminotransferasa mediante el uso de cebadores de las SEQ ID NO: 50 y 51; y gen *asd* que codifica la aspartato semialdehído deshidrogenasa mediante el uso de cebadores de las SEQ ID NO: 52, 53, 54 y 55. En particular, la cepa anterior con una ruta biosintética mejorada que produce O-acetil homoserina se designó como "W3-BTA2PCD" (también llamada "WCJM").

### <1-5> Experimentos de cultivo en matraces

La cantidad de producción de O-acetil homoserina por la cepa construida en los Ejemplos de referencia <1-3> y <1-

4> se ensayó mediante un cultivo en matraz Erlenmeyer.

Específicamente, las cepas *W3110*, *W3-BTA*, y *WCJM* se inocularon en medio LB y se cultivaron a 33 °C durante la noche. Después, se inoculó una sola colonia de estas en 3 mL de medio LB, se cultivó a 33 °C durante 5 horas, se diluyó 200 veces en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL de un medio productor de *O*-acetil homoserina, cultivado a 33 °C a una velocidad de 200 rpm durante 30 horas, y se examinó la cantidad de producción de *O*-acetil homoserina mediante análisis de HPLC. Las composiciones de medios usados se muestran en la Tabla 1 más abajo, y la cantidad de producción de *O*-acetil homoserina examinada se muestra en la Tabla 2 más abajo.

[Tabla 1] Composición del cultivo en matraz productor de *O*-acetil homoserina

Composición	Conc. (por litro)
glucosa	40 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	5 mg
MnSO <sub>4</sub> •8H <sub>2</sub> O	5 mg
ZnSO <sub>4</sub>	5 mg
CaCO <sub>3</sub>	30 g
extracto de levadura	2 g
metionina	0,15 g
treonina	0,15 g

[Tabla 2]

	OD (562 nm)	Consumo de glucosa (g/L)	<i>O</i> -acetil homoserina (g/L)
<i>W3110</i>	14,2	40	0
<i>W3-BTA</i>	8,4	36	0,9
<i>WCJM</i>	9,6	35	1,2

El resultado reveló que la *W3110* de tipo silvestre no produjo *O*-acetil homoserina en absoluto, mientras que la cepa *W3-BTA* produjo 0,9 g/L de *O*-acetil homoserina y la cepa *WCJM*, que se fortaleció con la vía de biosíntesis, produjo 1,2 g/L de *O*-acetil homoserina.

#### **Ejemplo 1: Deleción de la actividad citrato sintasa**

##### **<1-1> Construcción de un microorganismo con deleción del gen de la citrato sintasa en un microorganismo productor de *O*-acetil homoserina**

La citrato sintasa (GltA) es la enzima en la primera etapa del ciclo de los TCA, y comienza con la reacción entre el oxaloacetato y la acetil-CoA. Es bien conocida la inhibición del crecimiento por disminución del ciclo de los TCA (Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biol Wet. 2001; 66 (3a): 333-6). Sin embargo, para aumentar la cantidad de acetil-CoA usada como sustrato para la *O*-acetil homoserina, se debían producir las cepas *W3-BTA* y *WCJM* en las que se elimina la actividad citrato sintasa.

Específicamente, el gen de la citrato sintasa en las cepas *W3-BTA* y *WCJM* se eliminó mediante PCR basada en el vector *pKD4* como molde mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 56 y 57 de la siguiente manera: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 2 minutos. El producto de PCR resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 %, y se confirmó que el tamaño del gen era de 1,6 kb y se purificó su ADN. Los fragmentos de ADN recuperados se sometieron a electroporación en las cepas *W3-BTA* y *WCJM*, transformadas antes con el vector *pKD46*. Para la electroporación, las cepas *W3-BTA* y *WCJM*, transformadas con el vector *pKD46*, se cultivaron en un medio LB que contenía 100 µg/L de ampicilina y arabinosa 5 mM a 30 °C hasta una DO<sub>600</sub> = 0,6 y se lavaron dos veces con agua destilada y una vez con glicerol al 10 % para su uso. La electroporación se realizó a 2500 V. Las cepas así recuperadas se sembraron en estrías en placas LB que contenían 50 µg/L de kanamicina, se cultivaron a 37 °C, y se seleccionaron las cepas que mostraban resistencia.

Las cepas seleccionadas se sometieron a PCR mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 58 y 59 en las

mismas condiciones, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0 %, y se observó que el tamaño del gen era de 2,5 kb, lo que confirma de esta manera que un casete de delección se insertó en la porción del gen de la citrato sintasa en el cromosoma. Las cepas así confirmadas se transformaron nuevamente con el vector *pCP20*, se cultivaron en medio LB, y las cepas que tenían una delección del gen de la citrato sintasa, cuyo tamaño se redujo a 1,1 kb en un gel de agarosa al 1,0 %, se construyeron por PCR, y se confirmó que se eliminaron los marcadores de kanamicina. Las cepas así construidas se designaron como "*W3-BTA-AD*" y "*WCJM-AD*", respectivamente.

#### <1-2> Evaluación de un microorganismo con delección del gen de la citrato sintasa en un microorganismo productor de *O*-acetil homoserina

Las cepas *W3-BTA-AD* y *WCJM-AD* pueden crecer en un medio LB, pero debido a la delección del gen de la citrato sintasa, no pueden crecer en un medio que contiene *O*-acetil homoserina. Para probar la cantidad de producción de *O*-acetil homoserina, se realizó un cultivo en matraz Erlenmeyer bajo la condición (Tabla 3 - una composición que añade glutamato en el medio) de añadir 3 g/L de glutamato en la composición existente del medio de cultivo.

Específicamente, las cepas *W3-BTA-AD* y *WCJM-AD* se inocularon en medio LB y se cultivaron a 33 °C durante la noche. Después, se inoculó una sola colonia de estas en 3 mL de medio LB, se cultivó a 33 °C durante 5 horas, se diluyó 200 veces en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL de un medio productor de *O*-acetil homoserina (con glutamato añadido), se cultivó a 33 °C a una velocidad de 200 rpm durante 30 horas, y se examinó la cantidad de producción de *O*-acetil homoserina mediante análisis de HPLC. La cantidad de producción de *O*-acetil homoserina examinada se muestra en la Tabla 4 más abajo.

[Tabla 3] Composición de un medio con glutamato añadido a un medio basal

Composición	Conc. (por litro)
glucosa	40 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	5 mg
MnSO <sub>4</sub> •8H <sub>2</sub> O	5 mg
ZnSO <sub>4</sub>	5 mg
CaCO <sub>3</sub>	30 g
extracto de levadura	2 g
metionina	0,15 g
treonina	0,15 g
glutamato	3 g

[Tabla 4] Producción de *O*-acetil homoserina mediante cultivo en matraz

	OD (562 nm)	Consumo de glucosa (g/L)	<i>O</i> -acetil homoserina (g/L)	Glutamato (g/L)
<i>W3-BTA</i>	9,9	38	0,9	3,2
<i>W3-BTA-AD</i>	6,1	34	1,4	2,3
<i>WCJM</i>	9,2	37	1,3	3,5
<i>WCJM-AD</i>	5,6	33	2,1	1,7

El resultado de la producción de *O*-acetil homoserina mediante cultivo en matraz reveló que la cepa *W3-BTA* produjo 0,9 g/L de *O*-acetil homoserina, y *W3-BTA-AD* produjo 1,4 g/L de *O*-acetil homoserina, que es un aumento del 55,6 %, aunque mostró una disminución en su consumo de glucosa. La cepa *WCJM* produjo 1,3 g/L de *O*-acetil homoserina mientras que la cepa *WCJM-AD* produjo 2,1 g/L de *O*-acetil homoserina, lo que confirma así que la capacidad de producción de *O*-acetil homoserina mejoró en un 61,5 % debido a la delección del gen de la citrato sintasa.

#### **Ejemplo 2: atenuación de la actividad de la proteína citrato sintasa**

##### <2-1> Tipos de modificaciones del gen de la citrato sintasa

La cepa *WCJM-AD* construida en el Ejemplo <1-1> mostró una tasa de cultivo baja y se seleccionaron tres tipos

diferentes de variantes, que mostraron una actividad atenuada y una capacidad de unión reducida a acetil-CoA de acuerdo con varias modificaciones de la citrato sintasa conocidas en numerosas referencias (The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278, 35435-35443). La información de los tres diferentes tipos de variantes se muestra en la Tabla 5, que muestra los genes modificados en los que el 145° amino ácido, tirosina (Y), se sustituyó por alanina (A), y el 167° aminoácido, lisina (K), se sustituyó con alanina (A), y el 204° aminoácido, treonina (T), se sustituyó con alanina (A).

[Tabla 5]

Evaluación de las variantes de citrato sintasa (gltA)		
	VALOR KM [mM]	
	Acetil-CoA	OAA
SILVESTRE	0,12	0,026
Y145A	0,23	0,051
K167A	0,22	0,037
T204A	0,21	0,004

### <2-2> Construcción de un microorganismo con actividad de la proteína citrato sintasa atenuada en un microorganismo productor de O-acetil homoserina

Los presentes inventores pretendían aumentar la capacidad de producción mediante la introducción de variantes, en las que la actividad de la proteína citrato sintasa se atenuó como se explica en el Ejemplo <2-1>, en el microorganismo productor de O-acetil homoserina.

Con el fin de introducir los tres tipos diferentes de variantes del gen de la citrato sintasa en la cepa *WCJM-AD*, se diseñó un casete de reemplazo de modificación como se muestra en la Figura 1. Cada variante se sintetizó mediante la sustitución de un cebador con un nucleótido, y cada casete se construyó mediante 3 productos de PCR. Para la porción del gen de la citrato sintasa, se usó la cepa *W3110* como molde, y las reacciones de PCR que produjeron la modificación en el 145° amino ácido se realizaron mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 60 y 63 y SEQ ID NO: 62 y 61, respectivamente, y se obtuvieron productos de PCR con un tamaño de 514 pb y 1112 pb.

Asimismo, la modificación en el aminoácido 167° produjo productos de PCR con un tamaño de 580 pb y 1046 pb mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 60 y 65, y los cebadores de las SEQ ID NO: 64 y 61, y la modificación en el 204° aminoácido produjo productos de PCR con un tamaño de 688 pb y 936 pb mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 60 y 67 y SEQ ID NO: 66 y 61. Para la porción de kanamicina común, las reacciones de PCR se realizaron con base en el vector *pKD4* como molde mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 68 y 69. En particular, para la inserción en la posición del gen de la citrato sintasa, el casete se construyó para incluir la secuencia polinucleotídica corriente abajo del gen de la citrato sintasa en la SEQ ID NO: 69, y un producto de PCR con un tamaño de 1571 pb se obtuvo mediante electroforesis. Se realizó una reacción de PCR de extensión por superposición basada en el fragmento de ADN de kanamicina, que es la parte común con cada uno de los dos fragmentos de ADN recolectados de acuerdo con las modificaciones, respectivamente, mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 60 y 69, de la siguiente manera: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 4 minutos. Cada uno de los productos finales de PCR se confirmó en un gel de agarosa al 1,0 % y los fragmentos de ADN con un tamaño de 3115 pb para los tres tipos diferentes de casetes de modificaciones del gen de la citrato sintasa. Los fragmentos de ADN recolectados se sometieron a electroporación en la cepa *WCJM-AD*, transformada antes con el vector *pKD46*. Para la electroporación, la cepa *W3110* transformada con el *pKD46* se cultivó en un medio LB que contenía 100 µg/L de ampicilina y arabinosa 5 mM a 30 °C hasta una  $DO_{600} = 0,6$ , y se usó después de lavar dos veces con agua destilada estéril y una vez con 10 % de glicerol. La electroporación se realizó a 2500 V. La cepa recuperada se sembró en una placa LB que contenía 25 µg/L de kanamicina, se cultivó a 37 °C durante la noche, y se seleccionó la cepa que mostraba resistencia. La cepa seleccionada se sometió a una reacción de PCR en las mismas condiciones basadas en la cepa como molde mediante el uso de los mismos cebadores de las SEQ ID NO: 58 y 59, y se confirmó la delección del gen *metB* al observar el tamaño del gen de 3,7 kb en un gel de agarosa al 1,0 %, lo que confirma de esta manera que se insertó un casete de modificación, en el que se sustituyó el aminoácido del gen de la citrato sintasa. La cepa así confirmada se cultivó en medio LB después de volver a transformar con el vector *pCP20*, y se construyeron las tres cepas variantes con respecto a la actividad citrato sintasa, donde el tamaño del gen se redujo a 2,5 kb en un gel de agarosa al 1,0 % mediante PCR realizada bajo las mismas condiciones, y se confirmó la eliminación del marcador de kanamicina. Las cepas así construidas se designaron como "*WCJM-A145*", "*WCJM-A167*", y "*WCJM-A204*", y la información de secuencia del gen de la citrato sintasa introducido con modificaciones se muestran en las SEQ ID NO: 1 a 3 (secuencias de aminoácidos) y SEQ ID NO: 5 a 7 (secuencias de nucleótidos), respectivamente.

### <2-3> Evaluación de microorganismos con actividad de citrato sintasa atenuada en microorganismos

### productores de O-acetil homoserina

Se realizó un cultivo en matraz Erlenmeyer para examinar la cantidad de producción de O-acetil homoserina por tres cepas diferentes de *WCJM-A145*, *WCJM-A167*, y *WCJM-A204*, en las que se atenuó la actividad del gen de la citrato sintasa. Se inocularon cuatro tipos de cepas, es decir, cepas *WCJM-A145*, *WCJM-A167*, y *WCJM-A204*, incluida la cepa *WCJM*, en medio LB y se cultivaron a 33 °C durante la noche. Después, se inoculó una sola colonia de estas en 3 mL de medio LB, se cultivó a 33 °C durante 5 horas, se diluyó 200 veces en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL de un medio productor de O-acetil homoserina, cultivado a 33 °C a una velocidad de 200 rpm durante 30 horas, y se examinó la cantidad de producción de O-acetil homoserina mediante análisis de HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 6 más abajo.

[Tabla 6] Producción de O-acetil homoserina mediante cultivo en matraz

	OD (562 nm)	Consumo de glucosa (g/L)	O-acetil homoserina (g/L)	Glutamato (g/L)
<i>WCJM</i>	8,9	35	1,3	1,3
<i>WCJM-A145</i>	7,4	35	2,0	0
<i>WCJM-A167</i>	6,3	29	1,9	0
<i>WCJM-A204</i>	9,1	40	1,1	1,8

El resultado de la producción de O-acetil homoserina a través de cultivo en matraz reveló que la cepa *WCJM* produjo 1,3 g/L de O-acetil homoserina, y las dos cepas, *WCJM-A145* y *WCJM-A167*, produjeron 2,0 g/L y 1,9 g/L de O-acetil homoserina, respectivamente, mientras que la cantidad de su consumo de glucosa disminuyó junto con la disminución de su absorbancia (OD). Al considerar la disminución específica de glutamato de 1,3 g/L a 0 g/L, se confirmó que el resultado se debe a la disminución en el flujo del ciclo de los TCA causada por la atenuación en la actividad citrato sintasa. Sin embargo, la cepa *WCJM-A204* mostró un aumento en el glutamato mientras mostraba una disminución en la cantidad de producción de O-acetil homoserina a 0,2 g/L, lo que confirma así que la modificación es una con una actividad fortalecida.

### Ejemplo 3: atenuación en la expresión de la proteína citrato sintasa

#### <3-1> Construcción del vector de expresión para el ARN antisentido del gen de la citrato sintasa (ARNas)

Los presentes inventores hicieron un esfuerzo por aplicar una tecnología de ARN antisentido (ARNas) para atenuar la expresión de la proteína citrato sintasa. La tecnología de ARN antisentido es un método para reducir la expresión de proteínas al neutralizar la unión entre el ARNm de citrato sintasa y el ribosoma, mediante la sobreexpresión de la porción de unión complementaria al ARNm de la citrato sintasa del gen diana. Este método tiene la ventaja de que puede regular el nivel de inhibición mediante el control de la fuerza de unión con el ARNm del gen de la citrato sintasa, y este método también es útil para la construcción de un microorganismo recombinante porque este método puede construir y reducir eficazmente la expresión génica a través del ARN antisentido que controla la expresión génica, sin necesidad del proceso convencional de delección génica.

La construcción del vector se realizó al hacer referencia a una referencia (Methods Mol. Biol. 2012; 815: 307-19. doi: 10.1007/978-1-61779-424-7\_23.), y para la sobreexpresión, la región de ARN antisentido del gen de la sintasa debía introducirse en el plásmido *pBAD24* capaz de inducción. El mapa del vector *pBAD24*- RNAas de citrato sintasa se muestra en la Figura 2. La región donde se expresó el ARN antisentido del gen de la citrato sintasa tiene un tamaño de 100 pb, que incluye la región de 52 pb de la región promotora y la región de 48 pb del codón de iniciación de la citrato sintasa, y un par terminal de 38 pb (PT), que reduce la inestabilidad del ARN antisentido (ARNas), está conectada a ambas regiones flanqueantes. La región de ARN antisentido del gen de la citrato sintasa se obtuvo mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 70 y 71, y se incluyeron los sitios de restricción *Nco* I y *Hind* III para clonarlos en un vector.

El producto de PCR así obtenido tenía un tamaño de 194 pb, y el producto de PCR se clonó en el plásmido *pBAD24* después de tratarlos con *EcoRV* y *HindIII*, respectivamente. El plásmido así clonado se usó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ , y la *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada se seleccionó de las placas LB que contenían 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, y se obtuvo el plásmido de las mismas. El plásmido así obtenido se denominó "*pBAD24-gltA* asRNA".

#### <3-2> Introducción de un vector de expresión de ARN antisentido del gen de la citrato sintasa en un microorganismo productor de O-acetil homoserina y evaluación de este

El *pBAD24-gltA*-asRNA, un vector de expresión del ARN antisentido del gen de la citrato sintasa, se transformó en la cepa *WCJM*, que es un microorganismo productor de O-acetil homoserina. Aquí, la cepa transformada se denominó "*WCJM/A*-asRNA". En particular, se intentó controlar la cantidad de expresión de la proteína citrato sintasa mediante el control de la cantidad de expresión del ARN antisentido de la citrato sintasa, y aquí, la cantidad de expresión del ARN antisentido puede controlarse de acuerdo con la concentración de arabinosa.

Como resultado, se confirmó que la cantidad de producción de *O*-acetil homoserina aumentó cuando la actividad de la citrato sintasa se atenuó como en el Ejemplo 2.

- 5 Adicionalmente, se realizó un cultivo en matraz Erlenmeyer para examinar si la cantidad de producción de *O*-acetil homoserina aumenta a medida que disminuye la cantidad de expresión de la citrato sintasa.

10 Específicamente, las cepas *WCJM* y *WCJM/A-asRNA* se inocularon en medio LB y se cultivaron a 33 °C durante la noche. Después, se inoculó una sola colonia de este en 3 mL de medio LB, se cultivó a 33 °C durante 5 horas, se diluyó 200 veces en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL de un medio productor de *O*-acetil homoserina. En particular, para controlar la cantidad de expresión de ARN antisentido de la citrato sintasa, se añadió arabinosa en concentraciones de 0 mM, 2 mM y 5 mM, y se cultivó a 33 °C a una velocidad de 200 rpm durante 15 horas y 30 horas. La cantidad de producción de *O*-acetil homoserina se examinó mediante análisis de HPLC y los resultados se muestran en las Tablas 7 y 8 más abajo.

15 [Tabla 7]

15 horas	Arabinosa	OD (562 nm)	Consumo de glucosa (g/L)	<i>O</i> -acetil homoserina (g/L)
<i>WCJM</i>	0 mM	4,2	9,7	0,5
<i>WCJM</i>	2 mM	4,5	8,9	0,6
<i>WCJM</i>	5 mM	4,7	8,9	0,5
<i>WCJM/ A-asRNA</i>	0 mM	4,5	10,1	0,6
<i>WCJM/ A-asRNA</i>	2 mM	4,2	8,8	0,6
<i>WCJM/ A-asRNA</i>	5 mM	3,4	6,9	0,5

30 [Tabla 8]

30 horas	Arabinosa	OD (562 nm)	Consumo de glucosa (g/L)	<i>O</i> -acetil homoserina (g/L)
<i>WCJM</i>	0 mM	8,9	32	1,4
<i>WCJM</i>	2 mM	9,1	34	1,3
<i>WCJM</i>	5 mM	8,9	33	1,3
<i>WCJM/ A-asRNA</i>	0 mM	9,2	33	1,3
<i>WCJM/ A-asRNA</i>	2 mM	8,8	32	1,6
<i>WCJM/ A-asRNA</i>	5 mM	7,1	29	1,7

35 Como resultado, se confirmó que, cuando se cultivó durante 15 horas, la cepa *WCJM/A-asRNA* mostró una disminución de la OD en aproximadamente 1 de acuerdo con la concentración de arabinosa, mientras que la concentración de *O*-acetil homoserina fue similar. Sin embargo, cuando se cultivó durante 30 horas, la cepa *WCJM*, que es una cepa de control, mostró la misma OD y concentración de *O*-acetil homoserina incluso cuando la concentración de arabinosa aumentó, mientras que la cepa *WCJM/A-asRNA*, que es una cepa introducida con el vector de expresión para el ARN antisentido de la citrato sintasa, mostró una marcada diferencia a medida que aumentaba la concentración de arabinosa. La OD fue de 9,2 cuando la concentración de arabinosa fue 0 mM, mientras que la OD fue de 7,1 a 5 mM de la concentración de arabinosa, una disminución de 5,1, y la cantidad de *O*-acetil homoserina aumentó en un 30,8 % aunque el consumo de glucosa fue pequeño. A partir de estos resultados, se confirmó que no solo la atenuación en la actividad citrato sintasa, sino también en la atenuación en la expresión de proteínas exhiben los mismos resultados.

#### 55 **Ejemplo 4: Atenuación e inactivación de la actividad de la citrato sintasa en un microorganismo con alto rendimiento de producción de *O*-acetil homoserina**

##### **<4-1> Construcción de un microorganismo con alto rendimiento de producción de *O*-acetil homoserina con actividad de citrato sintasa inactivada y evaluación de este**

60 La publicación internacional núm. WO 2012/087039 describe en detalle un método para construir un microorganismo productor de *O*-acetil homoserina a partir de un microorganismo productor de treonina derivado de una cepa *W3110* de tipo silvestre, debido a una mutación NTG. En particular, la cepa construida que produce *O*-acetil homoserina con alto rendimiento se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) con el número de acceso de *KCCM 11146P*.

65 La cepa *KCCM11146P* puede consumir 40 g/L de glucosa durante un cultivo en matraz y produce aproximadamente

de 15 g/L a 16 g/L de *O*-acetil homoserina y, por lo tanto, se considera que tiene una alta capacidad de producción de *O*-acetil homoserina. Por consiguiente, para examinar si la cepa produce un mayor rendimiento de *O*-acetil homoserina cuando se elimina la actividad de la citrato sintasa, se aplicó lo mismo a la cepa *KCCM11146P*. El método de construcción fue el mismo que en el Ejemplo <1-1>, y por este método, la cepa *KCCM11146P*, donde se eliminó la actividad de la citrato sintasa, se construyó y se designó como "*KCCM11146P*-AD".

La cantidad de producción de *O*-acetil homoserina por la cepa *KCCM11146P*, donde se eliminó la actividad de la citrato sintasa, se ensayó mediante un cultivo en matraz Erlenmeyer. Se inoculó la cepa *KCCM11146P* o *KCCM11146P*-AD en un medio LB y se cultivó a 33 °C durante la noche. Después, se inoculó una sola colonia de estas en 3 mL de medio LB, se cultivó a 33 °C durante 5 horas, se diluyó 200 veces en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL de un medio productor de *O*-acetil homoserina (con glutamato añadido), y se cultivó a 33 °C a una velocidad de 200 rpm durante 30 horas. La cantidad de producción de *O*-acetil homoserina se examinó mediante análisis de HPLC y los resultados se muestran en la Tabla 9 a continuación.

[Tabla 9] Producción de *O*-acetil homoserina mediante cultivo en matraz

	OD (562 nm)	Consumo de glucosa (g/L)	<i>O</i> -acetil homoserina (g/L)	Glutamato (g/L)
<i>KCCM11146P</i>	18,3	60	14,2	4,6
<i>KCCM11146P</i> -AD	14,6	60	16,7	1,8

El resultado de la producción de *O*-acetil homoserina a través del cultivo en matraz reveló que la cepa *KCCM11146P* produjo 14,2 g/L de *O*-acetil homoserina, y la cepa *KCCM11146P*-AD produjo 16,7 g/L de *O*-acetil homoserina, un aumento del 17,6 % aunque mostró una disminución en la absorbancia (OD).

#### <4-2> Construcción de un microorganismo con alto rendimiento de producción de *O*-acetil homoserina con actividad de citrato sintasa atenuada y evaluación de este

Con el fin de examinar si la cepa *KCCM11146P*, que es una cepa con alto rendimiento de producción de *O*-acetil homoserina, produce un rendimiento más alto de *O*-acetil homoserina incluso cuando se atenúa la actividad de la citrato sintasa, la modificación en el 145° aminoácido (de tirosina (Y) a alanina (A)) y la modificación en el aminoácido 167° (de lisina (K) a alanina (A)), que mostró las mayores capacidades de producción de *O*-acetil homoserina entre los tres tipos de variantes que atenúan las actividades proteicas explicadas en el Ejemplo <2-1>, se aplicaron a la cepa *KCCM11146P*.

El método de construcción fue el mismo que en el Ejemplo <2-2>, y por el método, se construyeron dos cepas *KCCM11146P*, donde se atenuó la actividad citrato sintasa, y se designaron como "*KCCM11146P*-A145" y "*KCCM11146P*-A167", respectivamente.

La cantidad de producción de *O*-acetil homoserina por las dos cepas de *KCCM11146P*-A145 y *KCCM11146P*-A167, donde se atenuó la actividad de la citrato sintasa, se ensayó mediante un cultivo en matraz Erlenmeyer. Las tres cepas, es decir, las cepas *KCCM11146P*-A145 y *KCCM11146P*-A167 y la cepa *KCCM11146P*, se inocularon en medio LB y se cultivaron a 33 °C durante la noche. Después, se inoculó una sola colonia de estas en 3 mL de medio LB, se cultivó a 33 °C durante 5 horas, se diluyó 200 veces en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL de un medio productor de *O*-acetil homoserina, y se cultivó a 33 °C a una velocidad de 200 rpm durante 30 horas. La cantidad de producción de *O*-acetil homoserina se examinó mediante análisis de HPLC y los resultados se muestran en la Tabla 10 más abajo.

[Tabla 10] Producción de *O*-acetil homoserina mediante cultivo en matraz

	OD (562 nm)	Consumo de glucosa (g/L)	<i>O</i> -acetil homoserina (g/L)	Glutamato (g/L)
<i>KCCM11146P</i>	16,3	60	15,0	1,6
<i>KCCM11146P</i> -A145	14,6	60	17,5	0
<i>KCCM11146P</i> -A167	14,2	60	17,3	0

El resultado de la producción de *O*-acetil homoserina mediante cultivo en matraz reveló que la cepa *KCCM11146P* produjo 15,0 g/L de *O*-acetil homoserina, y las dos cepas de *KCCM11146P*-A145 y *KCCM11146P*-A167 mostraron resultados similares a los del Ejemplo <2-3>. Las dos cepas produjeron respectivamente 17,5 g/L y 17,3 g/L de *O*-acetil homoserina, un aumento de aproximadamente el 16,7 %, aunque ambas mostraron una disminución en la absorbancia (OD).

La cepa con alto rendimiento de producción de *O*-acetil homoserina también mostró una disminución de glutamato de 1,6 g/L a 0 g/L, de acuerdo con la disminución del flujo del ciclo de los TCA provocada por la atenuación de la actividad

de la citrato sintasa.

5 Estos resultados demuestran que la actividad de la citrato sintasa permite la producción de O-acetil homoserina mediante la aplicación de la modificación atenuada. Adicionalmente, también indican que cuando se lleva a cabo una reacción de conversión basada en la O-acetil homoserina, que se produjo de acuerdo con la publicación internacional núm. WO 2008/013432, como molde, y mediante el uso de una enzima de conversión, que adicionalmente tiene las actividades de cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa y O-acetil homoserina sulfhidrilasa, es posible sintetizar simultáneamente L-metionina y acetato.

10 Los presentes inventores confirmaron que la cepa *KCCM11146P*, la variante en el 167º aminoácido de la citrato sintasa, tiene una producción mejorada de O-acetil homoserina, designada la cepa *KCCM11146P-A167* como "CA05-4007", y depositado en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM), una autoridad internacional de depósito en virtud del Tratado de Budapest, el 22 de noviembre de 2013 (número de acceso *KCCM 11483P*).

15 Listado de Secuencias

<110> CJ CheilJedang Corporation

20 <120> Microorganismo que produce O-acetil homoserina y método para producir O-acetil homoserina mediante el uso del microorganismo

<130> OPA15136-PCT

<150> KR 10-2014-0076779

25 <151> 2014-06-23

<160> 71

30 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 427

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> GltA A145

40

<400> 1

45

50

55

60

65

ES 2 833 432 T3

5 Met Ala Asp Thr Lys Ala Lys Leu Thr Leu Asn Gly Asp Thr Ala Val  
1 5 10

Glu Leu Asp Val Leu Lys Gly Thr Leu Gly Gln Asp Val Ile Asp Ile  
20 25 30

10 Arg Thr Leu Gly Ser Lys Gly Val Phe Thr Phe Asp Pro Gly Phe Thr  
35 40 45

15 Ser Thr Ala Ser Cys Glu Ser Lys Ile Thr Phe Ile Asp Gly Asp Glu  
50 55 60

Gly Ile Leu Leu His Arg Gly Phe Pro Ile Asp Gln Leu Ala Thr Asp  
65 70 75 80

20 Ser Asn Tyr Leu Glu Val Cys Tyr Ile Leu Leu Asn Gly Glu Lys Pro  
85 90 95

25 Thr Gln Glu Gln Tyr Asp Glu Phe Lys Thr Thr Val Thr Arg His Thr  
100 105 110

Met Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Leu Phe His Ala Phe Arg Arg Asp  
115 120 125

30 Ser His Pro Met Ala Val Met Cys Gly Ile Thr Gly Ala Leu Ala Ala  
130 135 140

35 Phe Ala His Asp Ser Leu Asp Val Asn Asn Pro Arg His Arg Glu Ile  
145 150 155 160

Ala Ala Phe Arg Leu Leu Ser Lys Met Pro Thr Met Ala Ala Met Cys  
165 170 175

40 Tyr Lys Tyr Ser Ile Gly Gln Pro Phe Val Tyr Pro Arg Asn Asp Leu  
180 185 190

45 Ser Tyr Ala Gly Asn Phe Leu Asn Met Met Phe Ser Thr Pro Cys Glu  
195 200 205

45

50

55

60

65

ES 2 833 432 T3

5 Pro Tyr Glu Val Asn Pro Ile Leu Glu Arg Ala Met Asp Arg Ile Leu  
 210 215 220

Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln Asn Ala Ser Thr Ser Thr Val Arg  
 225 230 235 240

10 Thr Ala Gly Ser Ser Gly Ala Asn Pro Phe Ala Cys Ile Ala Ala Gly  
 245 250 255

Ile Ala Ser Leu Trp Gly Pro Ala His Gly Gly Ala Asn Glu Ala Ala  
 260 265 270

15 Leu Lys Met Leu Glu Glu Ile Ser Ser Val Lys His Ile Pro Glu Phe  
 275 280 285

20 Val Arg Arg Ala Lys Asp Lys Asn Asp Ser Phe Arg Leu Met Gly Phe  
 290 295 300

Gly His Arg Val Tyr Lys Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Thr Val Met Arg  
 305 310 315 320

25 Glu Thr Cys His Glu Val Leu Lys Glu Leu Gly Thr Lys Asp Asp Leu  
 325 330 335

30 Leu Glu Val Ala Met Glu Leu Glu Asn Ile Ala Leu Asn Asp Pro Tyr  
 340 345 350

Phe Ile Glu Lys Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe Tyr Ser Gly Ile  
 355 360 365

35 Ile Leu Lys Ala Met Gly Ile Pro Ser Ser Met Phe Thr Val Ile Phe  
 370 375 380

40 Ala Met Ala Arg Thr Val Gly Trp Ile Ala His Trp Ser Glu Met His  
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Met Lys Ile Ala Arg Pro Arg Gln Leu Tyr Thr Gly Tyr  
 405 410 415

45 Glu Lys Arg Asp Phe Lys Ser Asp Ile Lys Arg  
 420 425

50 <210> 2  
 <211> 427  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> GItA A167

<400> 2

60

65

ES 2 833 432 T3

5 Met Ala Asp Thr Lys Ala Lys Leu Thr Leu Asn Gly Asp Thr Ala Val  
1 5 10 15  
10 Glu Leu Asp Val Leu Lys Gly Thr Leu Gly Gln Asp Val Ile Asp Ile  
20 25 30  
10 Arg Thr Leu Gly Ser Lys Gly Val Phe Thr Phe Asp Pro Gly Phe Thr  
35 40 45  
15 Ser Thr Ala Ser Cys Glu Ser Lys Ile Thr Phe Ile Asp Gly Asp Glu  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

ES 2 833 432 T3

	50		55		60														
5	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Arg	Gly	Phe	Pro	Ile	Asp	Gln	Leu	Ala	Thr	Asp			
	65					70					75					80			
	Ser	Asn	Tyr	Leu	Glu	Val	Cys	Tyr	Ile	Leu	Leu	Asn	Gly	Glu	Lys	Pro			
10					85					90					95				
	Thr	Gln	Glu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Lys	Thr	Thr	Val	Thr	Arg	His	Thr			
				100					105					110					
15	Met	Ile	His	Glu	Gln	Ile	Thr	Arg	Leu	Phe	His	Ala	Phe	Arg	Arg	Asp			
			115					120					125						
	Ser	His	Pro	Met	Ala	Val	Met	Cys	Gly	Ile	Thr	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala			
		130					135					140							
20	Phe	Tyr	His	Asp	Ser	Leu	Asp	Val	Asn	Asn	Pro	Arg	His	Arg	Glu	Ile			
	145					150					155				160				
	Ala	Ala	Phe	Arg	Leu	Leu	Ser	Ala	Met	Pro	Thr	Met	Ala	Ala	Met	Cys			
25					165					170					175				
	Tyr	Lys	Tyr	Ser	Ile	Gly	Gln	Pro	Phe	Val	Tyr	Pro	Arg	Asn	Asp	Leu			
				180					185					190					
30	Ser	Tyr	Ala	Gly	Asn	Phe	Leu	Asn	Met	Met	Phe	Ser	Thr	Pro	Cys	Glu			
			195					200					205						
	Pro	Tyr	Glu	Val	Asn	Pro	Ile	Leu	Glu	Arg	Ala	Met	Asp	Arg	Ile	Leu			
			210				215					220							
35	Ile	Leu	His	Ala	Asp	His	Glu	Gln	Asn	Ala	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Arg			
	225					230					235				240				
	Thr	Ala	Gly	Ser	Ser	Gly	Ala	Asn	Pro	Phe	Ala	Cys	Ile	Ala	Ala	Gly			
40					245					250					255				
	Ile	Ala	Ser	Leu	Trp	Gly	Pro	Ala	His	Gly	Gly	Ala	Asn	Glu	Ala	Ala			
				260					265					270					
45	Leu	Lys	Met	Leu	Glu	Glu	Ile	Ser	Ser	Val	Lys	His	Ile	Pro	Glu	Phe			
			275					280					285						
	Val	Arg	Arg	Ala	Lys	Asp	Lys	Asn	Asp	Ser	Phe	Arg	Leu	Met	Gly	Phe			
							295					300							
50	Gly	His	Arg	Val	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Asp	Pro	Arg	Ala	Thr	Val	Met	Arg			
	305					310					315				320				
	Glu	Thr	Cys	His	Glu	Val	Leu	Lys	Glu	Leu	Gly	Thr	Lys	Asp	Asp	Leu			
55					325					330					335				
	Leu	Glu	Val	Ala	Met	Glu	Leu	Glu	Asn	Ile	Ala	Leu	Asn	Asp	Pro	Tyr			
				340					345					350					
60	Phe	Ile	Glu	Lys	Lys	Leu	Tyr	Pro	Asn	Val	Asp	Phe	Tyr	Ser	Gly	Ile			
			355					360					365						
	Ile	Leu	Lys	Ala	Met	Gly	Ile	Pro	Ser	Ser	Met	Phe	Thr	Val	Ile	Phe			
		370					375					380							
65	Ala	Met	Ala	Arg	Thr	Val	Gly	Trp	Ile	Ala	His	Trp	Ser	Glu	Met	His			



ES 2 833 432 T3

5 Met Ala Asp Thr Lys Ala Lys Leu Thr Leu Asn Gly Asp Thr Ala Val  
1 5 10

Glu Leu Asp Val Leu Lys Gly Thr Leu Gly Gln Asp Val Ile Asp Ile  
20 25 30

10 Arg Thr Leu Gly Ser Lys Gly Val Phe Thr Phe Asp Pro Gly Phe Thr  
35 40 45

15 Ser Thr Ala Ser Cys Glu Ser Lys Ile Thr Phe Ile Asp Gly Asp Glu  
50 55 60

20 Gly Ile Leu Leu His Arg Gly Phe Pro Ile Asp Gln Leu Ala Thr Asp  
65 70 75 80

25 Ser Asn Tyr Leu Glu Val Cys Tyr Ile Leu Leu Asn Gly Glu Lys Pro  
85 90 95

30 Thr Gln Glu Gln Tyr Asp Glu Phe Lys Thr Thr Val Thr Arg His Thr  
100 105 110

35 Met Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Leu Phe His Ala Phe Arg Arg Asp  
115 120 125

40 Ser His Pro Met Ala Val Met Cys Gly Ile Thr Gly Ala Leu Ala Ala  
130 135 140

45 Phe Tyr His Asp Ser Leu Asp Val Asn Asn Pro Arg His Arg Glu Ile  
145 150 155 160

50 Ala Ala Phe Arg Leu Leu Ser Lys Met Pro Thr Met Ala Ala Met Cys  
165 170 175

55 Tyr Lys Tyr Ser Ile Gly Gln Pro Phe Val Tyr Pro Arg Asn Asp Leu  
180 185 190

60 Ser Tyr Ala Gly Asn Phe Leu Asn Met Met Phe Ser Ala Pro Cys Glu  
195 200 205

65 Pro Tyr Glu Val Asn Pro Ile Leu Glu Arg Ala Met Asp Arg Ile Leu  
210 215 220

Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln Asn Ala Ser Thr Ser Thr Val Arg  
225 230 235 240

5 Thr Ala Gly Ser Ser Gly Ala Asn Pro Phe Ala Cys Ile Ala Ala Gly  
 245 250 255

Ile Ala Ser Leu Trp Gly Pro Ala His Gly Gly Ala Asn Glu Ala Ala  
 260 265 270

10 Leu Lys Met Leu Glu Glu Ile Ser Ser Val Lys His Ile Pro Glu Phe  
 275 280 285

Val Arg Arg Ala Lys Asp Lys Asn Asp Ser Phe Arg Leu Met Gly Phe  
 290 295 300

15 Gly His Arg Val Tyr Lys Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Thr Val Met Arg  
 305 310 315 320

20 Glu Thr Cys His Glu Val Leu Lys Glu Leu Gly Thr Lys Asp Asp Leu  
 325 330 335

Leu Glu Val Ala Met Glu Leu Glu Asn Ile Ala Leu Asn Asp Pro Tyr  
 340 345 350

25 Phe Ile Glu Lys Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe Tyr Ser Gly Ile  
 355 360 365

30 Ile Leu Lys Ala Met Gly Ile Pro Ser Ser Met Phe Thr Val Ile Phe  
 370 375 380

Ala Met Ala Arg Thr Val Gly Trp Ile Ala His Trp Ser Glu Met His  
 385 390 395 400

35 Ser Asp Gly Met Lys Ile Ala Arg Pro Arg Gln Leu Tyr Thr Gly Tyr  
 405 410 415

40 Glu Lys Arg Asp Phe Lys Ser Asp Ile Lys Arg  
 420 425

45 <210> 4  
 <211> 427  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

50 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(427)  
 <223> GltA

<400> 4

55

60

65

ES 2 833 432 T3

5 Met Ala Asp Thr Lys Ala Lys Leu Thr Leu Asn Gly Asp Thr Ala Val  
1 5 10 15  
Glu Leu Asp Val Leu Lys Gly Thr Leu Gly Gln Asp Val Ile Asp Ile  
20 25 30  
10 Arg Thr Leu Gly Ser Lys Gly Val Phe Thr Phe Asp Pro Gly Phe Thr  
35 40 45  
Ser Thr Ala Ser Cys Glu Ser Lys Ile Thr Phe Ile Asp Gly Asp Glu  
50 55 60  
15 Gly Ile Leu Leu His Arg Gly Phe Pro Ile Asp Gln Leu Ala Thr Asp

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 833 432 T3

	65					70						75				80
5	Ser	Asn	Tyr	Leu	Glu	Val	Cys	Tyr	Ile	Leu	Leu	Asn	Gly	Glu	Lys	Pro
					85					90					95	
	Thr	Gln	Glu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Lys	Thr	Thr	Val	Thr	Arg	His	Thr
10				100					105					110		
	Met	Ile	His	Glu	Gln	Ile	Thr	Arg	Leu	Phe	His	Ala	Phe	Arg	Arg	Asp
			115					120					125			
15	Ser	His	Pro	Met	Ala	Val	Met	Cys	Gly	Ile	Thr	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala
			130				135					140				
	Phe	Tyr	His	Asp	Ser	Leu	Asp	Val	Asn	Asn	Pro	Arg	His	Arg	Glu	Ile
	145					150					155					160
20	Ala	Ala	Phe	Arg	Leu	Leu	Ser	Lys	Met	Pro	Thr	Met	Ala	Ala	Met	Cys
					165					170					175	
	Tyr	Lys	Tyr	Ser	Ile	Gly	Gln	Pro	Phe	Val	Tyr	Pro	Arg	Asn	Asp	Leu
25				180					185					190		
	Ser	Tyr	Ala	Gly	Asn	Phe	Leu	Asn	Met	Met	Phe	Ser	Thr	Pro	Cys	Glu
			195					200					205			
30	Pro	Tyr	Glu	Val	Asn	Pro	Ile	Leu	Glu	Arg	Ala	Met	Asp	Arg	Ile	Leu
			210				215					220				
	Ile	Leu	His	Ala	Asp	His	Glu	Gln	Asn	Ala	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Arg
	225					230					235					240
35	Thr	Ala	Gly	Ser	Ser	Gly	Ala	Asn	Pro	Phe	Ala	Cys	Ile	Ala	Ala	Gly
					245					250					255	
	Ile	Ala	Ser	Leu	Trp	Gly	Pro	Ala	His	Gly	Gly	Ala	Asn	Glu	Ala	Ala
40				260					265					270		
	Leu	Lys	Met	Leu	Glu	Glu	Ile	Ser	Ser	Val	Lys	His	Ile	Pro	Glu	Phe
			275					280					285			
45	Val	Arg	Arg	Ala	Lys	Asp	Lys	Asn	Asp	Ser	Phe	Arg	Leu	Met	Gly	Phe
		290					295					300				
	Gly	His	Arg	Val	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Asp	Pro	Arg	Ala	Thr	Val	Met	Arg
	305					310					315					320
50	Glu	Thr	Cys	His	Glu	Val	Leu	Lys	Glu	Leu	Gly	Thr	Lys	Asp	Asp	Leu
					325					330					335	
	Leu	Glu	Val	Ala	Met	Glu	Leu	Glu	Asn	Ile	Ala	Leu	Asn	Asp	Pro	Tyr
55				340					345					350		
	Phe	Ile	Glu	Lys	Lys	Leu	Tyr	Pro	Asn	Val	Asp	Phe	Tyr	Ser	Gly	Ile
			355					360					365			
60	Ile	Leu	Lys	Ala	Met	Gly	Ile	Pro	Ser	Ser	Met	Phe	Thr	Val	Ile	Phe
		370					375					380				
	Ala	Met	Ala	Arg	Thr	Val	Gly	Trp	Ile	Ala	His	Trp	Ser	Glu	Met	His
	385					390					395					400
65	Ser	Asp	Gly	Met	Lys	Ile	Ala	Arg	Pro	Arg	Gln	Leu	Tyr	Thr	Gly	Tyr



ES 2 833 432 T3

5 <210> 6  
 <211> 1284  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> GItA A167

10 <400> 6

```

atggctgata caaaagcaaa actcaccctc aacggggata cagctgttga actggatgtg      60
15 ctgaaaggca cgctgggtca agatgttatt gatatccgta ctctcggttc aaaagggtgtg      120
   ttcacctttg acccaggctt cacttcaacc gcacccctgc aatctaaaat tacttttatt      180
   gatggatgat aaggatattt gctgcaccgc ggtttcccga tcgatcagct ggcgaccgat      240
20 tctaactacc tggaaagttg ttacatcctg ctgaatggtg aaaaaccgac tcaggaacag      300
   tatgacgaat ttaaaactac ggtgaccgtt catacctatg tccacgagca gattaccgtt      360
25 ctgttccatg ctttccgctc cgactcgcac ccaatggcag tcatgtgtgg tattaccggc      420
   gcgctggcgg cgttctatca cgactcgcctg gatgttaaca atcctcgtca ccgtgaaatt      480
   gccgcgttcc gcctgctgtc ggcgatgccg accatggccg cgatgtgtta caagtattcc      540
30 attggtcagc catttgttta cccgcgcaac gatctctcct acgccggtaa cttcctgaat      600
   atgatgttct ccacgccgtg cgaaccgtat gaagttaatc cgattctgga acgtgctatg      660
   gaccgtattc tgatcctgca cgctgaccat gaacagaacg cctctacctc caccgtgcgt      720
35 accgctggct cttcgggtgc gaaccggtt gcctgtatcg cagcaggtat tgcttactg      780
   tggggacctg cgcacggcgg tgctaacgaa gcgggcgtga aaatgctgga agaaatcagc      840
40 tccgttaaac acattccgga atttgttcgt cgtgcgaaag acaaaaatga ttctttccgc      900
   ctgatgggct tcggtcaccg cgtgtacaaa aattacgacc cgcgcgccac cgtaatgcgt      960
   gaaacctgcc atgaagtgtc gaaagagctg ggcacgaagg atgacctgct ggaagtggct      1020
45 atggagctgg aaaacatcgc gctgaacgac ccgtacttta tcgagaagaa actgtaccgg      1080
   aacgtcgatt tctactctgg tatcatcctg aaagcgatgg gtattccgtc ttccatgttc      1140
50 accgtcattt tcgcaatggc acgtaccgtt ggctggatcg cccactggag cgaaatgcac      1200
   agtgacggta tgaagattgc ccgtccgcgt cagctgtata caggatatga aaaacgcgac      1260
   tttaaaagcg atatcaagcg ttaa      1284
  
```

55 <210> 7  
 <211> 1284  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <223> GItA A204

65 <400> 7

ES 2 833 432 T3

atggctgata caaaagcaaa actcaccctc aacggggata cagctggtga actggatgtg 60  
 5 ctgaaaggca cgctgggtca agatgttatt gatatccgta ctctcgggtc aaaagggtgtg 120  
 ttcacctttg acccaggctt cacttcaacc gcatcctgcg aatctaaaat tacttttatt 180  
 gatggatgat aaggtatatt gctgcaccgc ggtttcccga tcgatcagct ggcgaccgat 240  
 10 tctaactacc tggaagtttg ttacatcctg ctgaatggtg aaaaaccgac tcaggaacag 300  
 tatgacgaat ttaaaactac ggtgaccctg cataccatga tccacgagca gattaccctg 360  
 15 ctgttccatg ctttcggtcg cgactcgcac ccaatggcag tcatgtgtgg tattaccggc 420  
 gcgctggcgg cgttctatca cgactcgcct gatgttaaca atcctcgtca ccgtgaaatt 480  
 gccgcgttcc gcctgctgtc gaaaatgccg accatggccg cgatgtgtta caagtattcc 540  
 20 attggtcagc catttgttta cccgcgcaac gatctctcct acgccggtaa cttcctgaat 600  
 atgatgttct ccgcgccgtg cgaaccgtat gaagttaatc cgattctgga acgtgctatg 660  
 25 gaccgtattc tgatcctgca cgctgaccat gaacagaacg cctctacctc caccgtgcgt 720  
 accgctggct cttcgggtgc gaaccggtt gcctgtatcg cagcaggtat tgcttccactg 780  
 tggggacctg cgcacggcgg tgctaacgaa gcggcgtga aaatgctgga agaaatcagc 840  
 30 tccgttaaac acattccgga atttgtcgt cgtgcgaaag acaaaaatga ttctttccgc 900  
 ctgatgggct tcggtcaccg cgtgtacaaa aattacgacc cgcgcgccac cgtaatgctg 960  
 gaaacctgcc atgaagtgtc gaaagagctg ggcacgaagg atgacctgct ggaagtggct 1020  
 35 atggagctgg aaaacatcgc gctgaacgac ccgtacttta tcgagaagaa actgtaccgg 1080  
 aacgtcgatt tctactctgg tatcatcctg aaagcgatgg gtattccgtc ttccatgttc 1140  
 40 accgtcattt tcgcaatggc acgtaccgtt ggctggatcg cccactggag cgaaatgcac 1200  
 agtgacggta tgaagattgc ccgtccgcgt cagctgtata caggatatga aaaacgcgac 1260  
 45 tttaaaagcg atatcaagcg ttaa 1284

<210> 8  
 <211> 1284  
 <212> ADN  
 50 <213> Escherichia coli

<220>  
 <221>gen  
 <221>(1) .. (1284)  
 55 <223> GltA

<400> 8

60

65

ES 2 833 432 T3

atggctgata caaaagcaaa actcaccctc aacggggata cagctggtga actggatgtg 60  
 5 ctgaaaggca cgctgggtca agatggttatt gatatccgta ctctcgggtc aaaaggtgtg 120  
 ttcacctttg acccaggctt cacttcaacc gcatcctgcg aatctaaaat tacttttatt 180  
 10 gatggatgat aaggtatfff gctgcaccgc ggtttcccgga tcgatcagct ggcgaccgat 240  
 tctaactacc tggaagtttg ttacatcctg ctgaatggtg aaaaaccgac tcaggaacag 300  
 tatgacgaat ttaaaactac ggtgaccctg cataccatga tccacgagca gattaccctg 360  
 15 ctggtccatg ctttccgtcg cgactcgcat ccaatggcag tcatgtgtgg tattaccggc 420  
 gcgctggcgg cgttctatca cgactcgctg gatgtaaca atcctcgta ccgtgaaatt 480  
 20 gccgcgttcc gcctgctgtc gaaaatgccg accatggccg cgatgtgta caagtattcc 540  
 attggtcagc catttgttta cccgcgcaac gatctctcct acgccggtaa cttcctgaat 600  
 atgatgttct ccacgccgtg cgaaccgtat gaagttaatc cgattctgga acgtgctatg 660  
 25 gaccgtattc tgatcctgca cgctgaccat gaacagaacg cctctacctc caccgtgcgt 720  
 accgctggct cttcgggtgc gaaccctgtt gcctgtatcg cagcaggtat tgcttcaactg 780  
 tggggacctg cgcacggcgg tgctaacgaa gcggcgctga aaatgctgga agaaatcagc 840  
 30 tccgttaaac acattccgga atttgttcgt cgtgcgaaag acaaaaatga ttctttccgc 900  
 ctgatgggct tcggtcaccg cgtgtacaaa aattacgacc cgcgcgccac cgtaatgcgt 960  
 35 gaaacctgcc atgaagtgcg gaaagagctg ggcacgaagg atgacctgct ggaagtggct 1020  
 atggagctgg aaaacatcgc gctgaacgac ccgtacttta tcgagaagaa actgtaccgc 1080  
 aacgtcgatt tctactctgg tatcatcctg aaagcgatgg gtattccgtc ttccatgttc 1140  
 40 accgtcattt tcgcaatggc acgtaccgtt ggctggatcg cccactggag cgaaatgcac 1200  
 agtgacggta tgaagattgc ccgtccgcgt cagctgtata caggatatga aaaacgcgac 1260  
 45 tttaaaagcg atatcaagcg ttaa 1284

<210> 9  
 <211> 386  
 <212> PRT  
 50 <213> Escherichia coli

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <221>(1) .. (386)  
 55 <223> metB

<400> 9

60

65

ES 2 833 432 T3

5 Met Thr Arg Lys Gln Ala Thr Ile Ala Val Arg Ser Gly Leu Asn Asp  
1 5 10 15  
10 Asp Glu Gln Tyr Gly Cys Val Val Pro Pro Ile His Leu Ser Ser Thr  
20 25 30  
10 Tyr Asn Phe Thr Gly Phe Asn Glu Pro Arg Ala His Asp Tyr Ser Arg  
35 40 45  
15 Arg Gly Asn Pro Thr Arg Asp Val Val Gln Arg Ala Leu Ala Glu Leu  
50 55 60  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

5  
 Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile  
 65 70 75 80

His Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala  
 85 90 95

10  
 Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala  
 100 105 110

Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln  
 115 120 125

15  
 Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu  
 130 135 140

20  
 Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys  
 145 150 155 160

His Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe  
 165 170 175

25  
 Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val  
 180 185 190

Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala  
 195 200 205

30  
 Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Asp Val Val Thr Glu Leu Ala Trp  
 210 215 220

35  
 Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu  
 225 230 235 240

Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln  
 245 250 255

40  
 Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val  
 260 265 270

45  
 Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile  
 275 280 285

Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu  
 290 295 300

50  
 Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu  
 305 310 315 320

Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His  
 325 330 335

55  
 Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala  
 340 345 350

60  
 Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp  
 355 360 365

Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn  
 370 375 380

65  
 Lys Gly  
 385

ES 2 833 432 T3

<210> 10  
 <211> 1161  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli  
 5  
 <220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(1161)  
 <223> metB  
 10  
 <400> 10  
 15  
 atgacgcgta aacaggccac catcgcagtg cgtagcgggt taaatgacga cgaacagtat 60  
 ggttgcggtg tcccaccgat ccatctttcc agcacctata actttaccgg atttaatgaa 120  
 20  
 ccgcgcgcgc atgattactc gcgctcgcggc aaccaacgc gcgatgtggt tcagcgtgcg  
 ctggcagaac tggaaagtgg tgctggtgca gtacttacta ataccggcat gtccgcgatt 240  
 cacctggtaa cgaccgtctt tttgaaacct ggcgatctgc tggttgcgcc gcacgactgc 300  
 25  
 tacggcggta gctatcgctt gttcgacagt ctggcgaaaac gcggttgcta tcgctggttg  
 tttggtgata aaggcgtgga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg 420  
 gtactggtag aaagcccaag taatccattg ttacgcgtcg tggatattgc gaaaatctgc 480  
 30  
 catctggcaa ggaagtggc ggcggtgagc gtggtggata acaccttctt aagcccggca  
 ttacaaaatc cgctggcatt aggtgccgat ctggtggtgc attcatgcac gaaatatctg 600  
 35  
 aacggtcact cagacgtagt ggccggcgtg gtgattgcta aagaccgga cgttgtcact 660  
 gaactggcct ggtgggcaaa caatattggc gtgacgggagc gcgctttga cagctatctg 720  
 ctgctacgtg ggttgcgaac gctggtgccg cgtatggagc tggcgcagcg caacgcgcag 780  
 40  
 gcgattgtga aatacctgca aaccagccg ttggtgaaaa aactgtatca cccgtcgttg 840  
 ccggaaaaatc aggggcatga aattgccgag cgccagcaaa aaggctttgg cgcaatggtg 900  
 45  
 agttttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcgtt tcctgggagc gctgtcgttg 960  
 tttacgctgg cggaatcatt agggggagtg gaaagttaa tctctcacgc cgcaaccatg 1020  
 acacatgcag gcatggcacc agaagcgcgt gctgccgccc ggatctccga gacgctgctg 1080  
 50  
 cgtatctcca ccggtattga agatggcga gatttaattg ccgacctgga aatggcttc 1140  
 cgggctgcaa acaaggggta a 1161

55  
 <210> 11  
 <211> 310  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 60  
 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(310)  
 <223> thrB  
 65  
 <400> 11

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

ES 2 833 432 T3

<210> 12  
 <211> 933  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli  
 5  
 <220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(933)  
 <223> thrB  
 10  
 <400> 12  
 15  
 atggttaaag tttatgcccc ggcttccagt gccaatatga gcgtcggggt tgatgtgctc 60  
 ggggcggcgg tgacacctgt tgatggtgca ttgctcggag atgtagtcac ggttgaggcg 120  
 20 gcagagacat tcagtctcaa caacctcgga cgctttgccc ataagctgcc gtcagaacca 180  
 cgggaaaata tcgtttatca gtgctgggag cgtttttgcc aggaactggg taagcaaatt 240  
 ccagtggcga tgaccctgga aaagaatatg ccgatcgggt cgggcttagg ctccagtgcc 300  
 25 tgttcgggtg tcgcggcgct gatggcgatg aatgaacact gcggcaagcc gcttaatgac 360  
 actcgtttgc tggctttgat gggcgagctg gaaggccgta tctccggcag cattcattac 420  
 gacaacgtgg caccgtgttt tctcggtggt atgcagttga tgatcgaaga aaacgacatc 480  
 30 atcagccagc aagtgccagg gtttgatgag tggctgtggg tgctggcgta tccggggatt 540  
 aaagtctcga cggcagaagc cagggctatt ttaccggcgc agtatcgccg ccaggattgc 600  
 35 attgcgcacg ggcgacatct ggcaggcttc attcacgcct gctattcccg tcagcctgag 660  
 cttgccgcga agctgatgaa agatgttatc gctgaaccct accgtgaacg gttactgcc 720  
 ggcttccggc aggcgcggca ggcggtcgcg gaaatcggcg cggtagcgag cggtatctcc 780  
 40 ggctccggcc cgacctgtt cgctctgtgt gacaagccgg aaaccgcca gcgcgttgc 840  
 gactggttgg gtaagaacta cctgcaaaat caggaagggt ttgttcatat ttgccggctg 900  
 45 gatacggcgg gcgcacgagt actggaaaac taa 933

<210> 13  
 <211> 379  
 <212> PRT  
 <213> Leptospira meyeri  
 50  
 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(379)  
 <223> homoserina O-acetiltransferasa  
 55  
 <400> 13  
 60  
 Met Pro Thr Ser Glu Gln Asn Glu Phe Ser His Gly Ser Val Gly Val  
 1 5 10 15  
 65  
 Val Tyr Thr Gln Ser Ile Arg Phe Glu Ser Leu Thr Leu Glu Gly Gly  
 20 25 30

5  
 Glu Thr Ile Thr Pro Leu Glu Ile Ala Tyr Glu Thr Tyr Gly Thr Leu  
 35 40 45

Asn Glu Lys Lys Asp Asn Ala Ile Leu Val Cys His Ala Leu Ser Gly  
 50 55 60

10  
 Asp Ala His Ala Ala Gly Phe His Glu Gly Asp Lys Arg Pro Gly Trp  
 65 70 75 80

Trp Asp Tyr Tyr Ile Gly Pro Gly Lys Ser Phe Asp Thr Asn Arg Tyr  
 85 90 95

15  
 Phe Ile Ile Ser Ser Asn Val Ile Gly Gly Cys Lys Gly Ser Ser Gly  
 100 105 110

20  
 Pro Leu Thr Ile Asn Gly Lys Asn Gly Lys Pro Phe Gln Ser Thr Phe  
 115 120 125

Pro Phe Val Ser Ile Gly Asp Met Val Asn Ala Gln Glu Lys Leu Ile  
 130 135 140

25  
 Ser His Phe Gly Ile His Lys Leu Phe Ala Val Ala Gly Gly Ser Met  
 145 150 155 160

Gly Gly Met Gln Ala Leu Gln Trp Ser Val Ala Tyr Pro Asp Arg Leu  
 165 170 175

30  
 Lys Asn Cys Ile Val Met Ala Ser Ser Ser Glu His Ser Ala Gln Gln  
 180 185 190

35  
 Ile Ala Phe Asn Glu Val Gly Arg Gln Ala Ile Leu Ser Asp Pro Asn  
 195 200 205

Trp Asn Gln Gly Leu Tyr Thr Gln Glu Asn Arg Pro Ser Lys Gly Leu  
 210 215 220

40  
 Ala Leu Ala Arg Met Met Gly His Ile Thr Tyr Leu Ser Asp Glu Met  
 225 230 235 240

Met Arg Glu Lys Phe Gly Arg Lys Pro Pro Lys Gly Asn Ile Gln Ser  
 245 250 255

45  
 Thr Asp Phe Ala Val Gly Ser Tyr Leu Ile Tyr Gln Gly Glu Ser Phe  
 260 265 270

50  
 Val Asp Arg Phe Asp Ala Asn Ser Tyr Ile Tyr Val Thr Lys Ala Leu  
 275 280 285

Asp His Phe Ser Leu Gly Thr Gly Lys Glu Leu Thr Lys Val Leu Ala  
 290 295 300

55  
 Lys Val Arg Cys Arg Phe Leu Val Val Ala Tyr Thr Ser Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Tyr Pro Pro Tyr Gln Ser Glu Glu Ile Val Lys Ser Leu Glu Val Asn  
 325 330 335

60  
 Ala Val Pro Val Ser Phe Val Glu Leu Asn Asn Pro Ala Gly Arg His  
 340 345 350

65  
 Asp Ser Phe Leu Leu Pro Ser Glu Gln Gln Asp Ser Ile Leu Arg Asp  
 355 360 365

Phe Leu Ser Ser Thr Asp Glu Gly Val Phe Leu  
370 375

5

<210> 14

<211> 379

10 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> PÉPTIDO

15 <222> (1)..(379)

<223> homoserina O-acetiltransferasa

<400> 14

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5 Met Pro Thr Leu Ala Pro Ser Gly Gln Leu Glu Ile Gln Ala Ile Gly  
1 5 10 15  
Asp Val Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ile Ile Thr Asn Ala Glu Ile Ala  
20 25 30  
10 Tyr His Arg Trp Gly Glu Tyr Arg Val Asp Lys Glu Gly Arg Ser Asn  
35 40 45  
Val Val Leu Ile Glu His Ala Leu Thr Gly Asp Ser Asn Ala Ala Asp  
50 55 60  
15 Trp Trp Ala Asp Leu Leu Gly Pro Gly Lys Ala Ile Asn Thr Asp Ile  
65 70 75 80  
20 Tyr Cys Val Ile Cys Thr Asn Val Ile Gly Gly Cys Asn Gly Ser Thr  
85 90 95  
Gly Pro Gly Ser Met His Pro Asp Gly Asn Phe Trp Gly Asn Arg Phe  
100 105 110  
25 Pro Ala Thr Ser Ile Arg Asp Gln Val Asn Ala Glu Lys Gln Phe Leu  
115 120 125  
30 Asp Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Ala Ala Val Val Leu Leu Gly Gly  
130 135 140  
Ser Met Gly Gly Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ala Ala Met Tyr Pro Glu  
145 150 155 160  
35 Thr Val Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Val Ser Ala Arg Ala Ser Ala  
165 170 175  
40 Trp Gln Ile Gly Ile Gln Ser Ala Gln Ile Lys Ala Ile Glu Asn Asp  
180 185 190  
His His Trp His Glu Gly Asn Tyr Tyr Glu Ser Gly Cys Asn Pro Ala  
195 200 205  
45 Thr Gly Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Ala His Leu Thr Tyr Arg Gly  
210 215 220  
Glu Leu Glu Ile Asp Glu Arg Phe Gly Thr Lys Ala Gln Lys Asn Glu  
225 230 235 240  
50 Asn Pro Leu Gly Pro Tyr Arg Lys Pro Asp Gln Arg Phe Ala Val Glu

55  
60  
65

ES 2 833 432 T3

				245					250					255		
5	Ser	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Gln	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Arg	Phe	Asp	Ala
				260					265					270		
10	Gly	Ser	Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Arg	His	Asp	Ile	Gly
			275					280					285			
15	Arg	Asp	Arg	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	Val	Pro
		290					295					300				
20	Val	Leu	Val	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Asp	Ile	Leu	Tyr	Pro	Tyr	His	Gln
	305					310					315					320
25	Gln	Glu	His	Leu	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Met	Ala	Lys
				325						330					335	
30	Ile	Val	Ser	Pro	Val	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln
			340						345					350		
35	Met	Asp	Arg	Ile	Val	Arg	Asn	Phe	Phe	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Asp	Glu
		355						360					365			
40	Asp	Asn	Pro	Ser	Thr	Tyr	Ile	Glu	Phe	Tyr	Ile					
		370					375									

<210> 15  
 <211> 334  
 <212> PRT  
 <213> Deinococcus radiodurans  
 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(334)  
 <223> homoserina O-acetiltransferasa  
 <400> 15

ES 2 833 432 T3

5 Met Thr Ala Val Leu Ala Gly His Ala Ser Ala Leu Leu Leu Thr Glu  
1 5 10 15

Glu Pro Asp Cys Ser Gly Pro Gln Thr Val Val Leu Phe Arg Arg Glu  
20 25 30

10 Pro Leu Leu Leu Asp Cys Gly Arg Ala Leu Ser Asp Val Arg Val Ala  
35 40 45

15 Phe His Thr Tyr Gly Thr Pro Arg Ala Asp Ala Thr Leu Val Leu His  
50 55 60

Ala Leu Thr Gly Asp Ser Ala Val His Glu Trp Trp Pro Asp Phe Leu  
65 70 75 80

20 Gly Ala Gly Arg Pro Leu Asp Pro Ala Asp Asp Tyr Val Val Cys Ala  
85 90 95

25 Asn Val Leu Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Ser Ala Ala Glu Leu Ala  
100 105 110

Ala Thr Cys Ser Gly Pro Val Pro Leu Ser Leu Arg Asp Met Ala Arg  
115 120 125

30

35

40

45

50

55

60

65

5 Val Gly Arg Ala Leu Leu Asp Ser Leu Gly Val Arg Arg Val Arg Val  
 130 135 140

Ile Gly Ala Ser Met Gly Gly Met Leu Ala Tyr Ala Trp Leu Leu Glu  
 145 150 155 160

10 Cys Pro Asp Leu Val Glu Lys Ala Val Ile Ile Gly Ala Pro Ala Arg  
 165 170 175

His Ser Pro Trp Ala Ile Gly Leu Asn Thr Ala Ala Arg Ser Ala Ile  
 180 185 190

15 Ala Leu Ala Pro Gly Gly Glu Gly Leu Lys Val Ala Arg Gln Ile Ala  
 195 200 205

20 Met Leu Ser Tyr Arg Ser Pro Glu Ser Leu Ser Arg Thr Gln Ala Gly  
 210 215 220

Gln Arg Val Pro Gly Val Pro Ala Val Thr Ser Tyr Leu His Tyr Gln  
 225 230 235 240

25 Gly Glu Lys Leu Ala Ala Arg Phe Asp Glu Gln Thr Tyr Cys Ala Leu  
 245 250 255

30 Thr Trp Ala Met Asp Ala Phe Gln Pro Ser Ser Ala Asp Leu Lys Ala  
 260 265 270

Val Arg Ala Pro Val Leu Val Val Gly Ile Ser Ser Asp Leu Leu Tyr  
 275 280 285

35 Pro Ala Ala Glu Val Arg Ala Cys Ala Ala Glu Leu Pro His Ala Asp  
 290 295 300

40 Tyr Trp Glu Leu Gly Ser Ile His Gly His Asp Ala Phe Leu Met Asp  
 305 310 315 320

Pro Gln Asp Leu Pro Glu Arg Val Gly Ala Phe Leu Arg Ser  
 325 330

45

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

50

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(309)  
 <223> homoserina O-succiniltransferasa

55

<400> 16

60

65

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

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

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

15 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

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

25 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

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

35 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

40 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

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

50 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

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

60 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

65 Asn Pro Thr Leu Asp  
305

ES 2 833 432 T3

<210> 17  
<211> 309  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5

<220>  
<223> Polipéptido variante que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa, metA EL

10

<400> 17

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

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5           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

10          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

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

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

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

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

30          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

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

40          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

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

50          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

55          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

60          Asn Pro Thr Leu Asp  
                                  305

65        <210> 18  
          <211> 309  
          <212> PRT

ES 2 833 432 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido variante que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa, metA ET

5

<400> 18

10 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 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

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

ES 2 833 432 T3

<210> 19  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polipéptido variante que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa, metA EH

<400> 19

15	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		
20	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
25		50					55					60				
	Val	Asp	Ile	Gln	Leu	Leu	Arg	Ile	Asp	Ser	Arg	Glu	Ser	Arg	Asn	Thr
	65					70				75						80
30	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	Glu	His
35				100					105					110		
	Val	Glu	Phe	Asn	Asp	Val	Ala	Tyr	Trp	Pro	Gln	Ile	Lys	Gln	Val	Leu
			115					120					125			
40	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
45						150					155					160
	Thr	Glu	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Tyr	Glu	His	His	Ile	Leu	His	Pro	His
					165					170					175	
50	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			
55	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
60		225				230					235					240
	Gln	Thr	Leu	Ala	Gln	Glu	Phe	Phe	Arg	Asp	Val	Glu	Ala	Gly	Leu	Asp
					245					250					255	



5 Met Asn Glu Gln Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Asn Val Ser Met Leu Gly  
1 5 10

Lys Val Leu Gly Glu Thr Ile Lys Asp Ala Leu Gly Glu His Ile Leu  
20 25 30

10 Glu Arg Val Glu Thr Ile Arg Lys Leu Ser Lys Ser Ser Arg Ala Gly  
35 40 45

Asn Asp Ala Asn Arg Gln Glu Leu Leu Thr Thr Leu Gln Asn Leu Ser  
50 55 60

15 Asn Asp Glu Leu Leu Pro Val Ala Arg Ala Phe Ser Gln Phe Leu Asn  
65 70 75 80

20 Leu Ala Asn Thr Ala Glu Gln Tyr His Ser Ile Ser Pro Lys Gly Glu  
85 90 95

Ala Ala Ser Asn Pro Glu Val Ile Ala Arg Thr Leu Arg Lys Leu Lys  
100 105 110

25 Asn Gln Pro Glu Leu Ser Glu Asp Thr Ile Lys Lys Ala Val Glu Ser  
115 120 125

30 Leu Ser Leu Glu Leu Val Leu Thr Ala His Pro Thr Glu Ile Thr Arg  
130 135 140

Arg Thr Leu Ile His Lys Met Val Glu Val Asn Ala Cys Leu Lys Gln  
145 150 155 160

35 Leu Asp Asn Lys Asp Ile Ala Asp Tyr Glu His Asn Gln Leu Met Arg  
165 170 175

40 Arg Leu Arg Gln Leu Ile Ala Gln Ser Trp His Thr Asp Glu Ile Arg  
180 185 190

Lys Leu Arg Pro Ser Pro Val Asp Glu Ala Lys Trp Gly Phe Ala Val

45

50

55

60

65



ES 2 833 432 T3

	530		535		540														
5	Ala 545	Lys	Asp	Ala	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Ser	Trp	Ala	Gln	Tyr	Gln	Ala			
						550					555					560			
	Gln	Asp	Ala	Leu	Ile	Lys	Thr	Cys	Glu	Lys	Ala	Gly	Ile	Glu	Leu	Thr			
					565					570					575				
10	Leu	Phe	His	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Ile	Gly	Arg	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala			
				580					585					590					
15	His	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Gln	Pro	Pro	Gly	Ser	Leu	Lys	Gly	Gly	Leu			
			595					600					605						
	Arg	Val	Thr	Glu	Gln	Gly	Glu	Met	Ile	Arg	Phe	Lys	Tyr	Gly	Leu	Pro			
		610					615					620							
20	Glu	Ile	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	Tyr	Thr	Gly	Ala	Ile	Leu	Glu			
	625					630					635					640			
	Ala	Asn	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Pro	Lys	Glu	Ser	Trp	Arg	Arg	Ile			
					645					650					655				
25	Met	Asp	Glu	Leu	Ser	Val	Ile	Ser	Cys	Asp	Val	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Val			
				660					665					670					
	Arg	Glu	Asn	Lys	Asp	Phe	Val	Pro	Tyr	Phe	Arg	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu			
			675					680					685						
	Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Arg	Pro	Ala	Lys	Arg	Arg			
							695					700							
35	Pro	Thr	Gly	Gly	Val	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Ile	Pro	Trp	Ile	Phe	Ala			
	705					710					715				720				
	Trp	Thr	Gln	Asn	Arg	Leu	Met	Leu	Pro	Ala	Trp	Leu	Gly	Ala	Gly	Thr			
				725						730					735				
40	Ala	Leu	Gln	Lys	Val	Val	Glu	Asp	Gly	Lys	Gln	Ser	Glu	Leu	Glu	Ala			
				740				745						750					
45	Met	Cys	Arg	Asp	Trp	Pro	Phe	Phe	Ser	Thr	Arg	Leu	Gly	Met	Leu	Glu			
			755					760					765						
	Met	Val	Phe	Ala	Lys	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gln			
		770					775					780							
50	Arg	Leu	Val	Asp	Lys	Ala	Leu	Trp	Pro	Leu	Gly	Lys	Glu	Leu	Arg	Asn			
	785					790					795				800				
	Leu	Gln	Glu	Glu	Asp	Ile	Lys	Val	Val	Leu	Ala	Ile	Ala	Asn	Asp	Ser			
				805						810					815				
55	His	Leu	Met	Ala	Asp	Leu	Pro	Trp	Ile	Ala	Glu	Ser	Ile	Gln	Leu	Arg			
				820					825					830					
	Asn	Ile	Tyr	Thr	Asp	Pro	Leu	Asn	Val	Leu	Gln	Ala	Glu	Leu	Leu	His			
			835				840						845						
60	Arg	Ser	Arg	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Gln	Glu	Pro	Asp	Pro	Arg	Val			
		850					855					860							
65	Glu	Gln	Ala	Leu	Met	Val	Thr	Ile	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Met	Arg			

ES 2 833 432 T3

	865		870		875		880									
5	Asn Thr Gly															
10	<210> 21 <211> 396 <212> PRT <213> Escherichia coli															
15	<220> <221> PÉPTIDO <222> (1)..(396) <223> aspartato aminotransferasa															
20	<400> 21															
25	Met	Phe	Glu	Asn	Ile	Thr	Ala	Ala	Pro	Ala	Asp	Pro	Ile	Leu	Gly	Leu
	1				5					10					15	
30	Ala	Asp	Leu	Phe	Arg	Ala	Asp	Glu	Arg	Pro	Gly	Lys	Ile	Asn	Leu	Gly
				20					25					30		
35	Ile	Gly	Val	Tyr	Lys	Asp	Glu	Thr	Gly	Lys	Thr	Pro	Val	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
40	Val	Lys	Lys	Ala	Glu	Gln	Tyr	Leu	Leu	Glu	Asn	Glu	Thr	Thr	Lys	Asn
		50					55					60				
45	Tyr	Leu	Gly	Ile	Asp	Gly	Ile	Pro	Glu	Phe	Gly	Arg	Cys	Thr	Gln	Glu
	65					70					75					80
50	Leu	Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	Ala	Leu	Ile	Asn	Asp	Lys	Arg	Ala	Arg
					85					90					95	
55	Thr	Ala	Gln	Thr	Pro	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Ala	Asp
				100					105					110		
60	Phe	Leu	Ala	Lys	Asn	Thr	Ser	Val	Lys	Arg	Val	Trp	Val	Ser	Asn	Pro
			115					120					125			
65	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Lys	Ser	Val	Phe	Asn	Ser	Ala	Gly	Leu	Glu	Val
		130					135					140				
70	Arg	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Glu	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Phe	Asp
	145					150					155					160
75	Ala	Leu	Ile	Asn	Ser	Leu	Asn	Glu	Ala	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Val	Leu
				165						170					175	
80	Phe	His	Gly	Cys	Cys	His	Asn	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Pro	Thr	Leu	Glu
				180					185					190		
85	Gln	Trp	Gln	Thr	Leu	Ala	Gln	Leu	Ser	Val	Glu	Lys	Gly	Trp	Leu	Pro
			195					200					205			
90	Leu	Phe	Asp	Phe	Ala	Tyr	Gln	Gly	Phe	Ala	Arg	Gly	Leu	Glu	Glu	Asp
		210					215					220				
95	Ala	Glu	Gly	Leu	Arg	Ala	Phe	Ala	Ala	Met	His	Lys	Glu	Leu	Ile	Val
	225						230				235					240

5 Ala Ser Ser Tyr Ser Lys Asn Phe Gly Leu Tyr Asn Glu Arg Val Gly  
 245 250 255

Ala Cys Thr Leu Val Ala Ala Asp Ser Glu Thr Val Asp Arg Ala Phe  
 260 265 270

10 Ser Gln Met Lys Ala Ala Ile Arg Ala Asn Tyr Ser Asn Pro Pro Ala  
 275 280 285

His Gly Ala Ser Val Val Ala Thr Ile Leu Ser Asn Asp Ala Leu Arg  
 290 295 300

15 Ala Ile Trp Glu Gln Glu Leu Thr Asp Met Arg Gln Arg Ile Gln Arg  
 305 310 315 320

20 Met Arg Gln Leu Phe Val Asn Thr Leu Gln Glu Lys Gly Ala Asn Arg  
 325 330 335

Asp Phe Ser Phe Ile Ile Lys Gln Asn Gly Met Phe Ser Phe Ser Gly  
 340 345 350

25 Leu Thr Lys Glu Gln Val Leu Arg Leu Arg Glu Glu Phe Gly Val Tyr  
 355 360 365

30 Ala Val Ala Ser Gly Arg Val Asn Val Ala Gly Met Thr Pro Asp Asn  
 370 375 380

Met Ala Pro Leu Cys Glu Ala Ile Val Ala Val Leu  
 385 390 395

35

<210> 22  
 <211> 367  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

40

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(367)  
 <223> aspartato-semialdehído deshidrogenasa

45

<400> 22

50

55

60

65

ES 2 833 432 T3

5 Met Lys Asn Val Gly Phe Ile Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val  
1 5 10  
Leu Met Gln Arg Met Val Glu Glu Arg Asp Phe Asp Ala Ile Arg Pro  
20 25 30  
10 Val Phe Phe Ser Thr Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ala Pro Ser Phe Gly  
35 40 45  
Gly Thr Thr Gly Thr Leu Gln Asp Ala Phe Asp Leu Glu Ala Leu Lys  
50 55 60  
15 Ala Leu Asp Ile Ile Val Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Glu  
65 70 75 80  
20 Ile Tyr Pro Lys Leu Arg Glu Ser Gly Trp Gln Gly Tyr Trp Ile Asp  
85 90 95  
Ala Ala Ser Ser Leu Arg Met Lys Asp Asp Ala Ile Ile Ile Leu Asp  
100 105 110  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

5 Pro Val Asn Gln Asp Val Ile Thr Asp Gly Leu Asn Asn Gly Ile Arg  
115 120 125

Thr Phe Val Gly Gly Asn Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ser Leu  
130 135 140

10 Gly Gly Leu Phe Ala Asn Asp Leu Val Asp Trp Val Ser Val Ala Thr  
145 150 155 160

15 Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Gly Gly Ala Arg His Met Arg Glu Leu Leu  
165 170 175

Thr Gln Met Gly His Leu Tyr Gly His Val Ala Asp Glu Leu Ala Thr  
180 185 190

20 Pro Ser Ser Ala Ile Leu Asp Ile Glu Arg Lys Val Thr Thr Leu Thr  
195 200 205

25 Arg Ser Gly Glu Leu Pro Val Asp Asn Phe Gly Val Pro Leu Ala Gly  
210 215 220

30 Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Gln Leu Asp Asn Gly Gln Ser Arg  
225 230 235 240

Glu Glu Trp Lys Gly Gln Ala Glu Thr Asn Lys Ile Leu Asn Thr Ser  
245 250 255

35 Ser Val Ile Pro Val Asp Gly Leu Cys Val Arg Val Gly Ala Leu Arg  
260 265 270

Cys His Ser Gln Ala Phe Thr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Val Ser Ile  
275 280 285

40 Pro Thr Val Glu Glu Leu Leu Ala Ala His Asn Pro Trp Ala Lys Val  
290 295 300

45 Val Pro Asn Asp Arg Glu Ile Thr Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala  
305 310 315 320

Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn  
325 330 335

50 Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu  
340 345 350

Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala  
355 360 365

55  
60 <210> 23  
<211> 933  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli

65 <220>  
<221> gen  
<222> (1)..(933)  
<223> homoserina O-succiniltransferasa

ES 2 833 432 T3

<400> 23

	atggttaaag tttatgcccc ggcttccagt gccaatatga gcgtcggggt tgatgtgctc	60
5	ggggcggcgg tgacacctgt tgatgggtgca ttgctcggag atgtagtcac ggttgaggcg	120
	gcagagacat tcagttctcaa caacctcggg cgctttgccc ataagctgcc gtcagaacca	180
	cgggaaaata tcgtttatca gtgctgggag cgtttttgcc aggaactggg taagcaaatt	240
10	ccagtggcga tgacctgga aaagaatatg ccgatcgggt cgggcttagg ctccagtgcc	300
	tgttcgggtg tcgcggcgct gatggcgatg aatgaacact gcggcaagcc gcttaatgac	360
15	actcgtttgc tggctttgat gggcgagctg gaaggccgta tctccggcag cattcattac	420
	gacaacgtgg caccgtgttt tctcgggtgt atgcagttga tgatcgaaga aaacgacatc	480
	atcagccagc aagtgccagg gtttgatgag tggctgtggg tgctggcgta tccggggatt	540
20	aaagtctcga cggcagaagc cagggctatt ttaccggcgc agtatcgccg ccaggattgc	600
	attgcgcacg ggcgacatct ggcaggcttc attcacgcct gctattcccg tcagcctgag	660
25	cttgccgcga agctgatgaa agatgttatc gctgaaccct accgtgaacg gttactgcca	720
	ggcttccggc aggcgcggca ggcggctcgc gaaatcggcg cggtagcgag cggtatctcc	780
	ggctccggcc cgacctgtt cgctctgtgt gacaagccgg aaaccgcca gcgcgttgcc	840
30	gactggttgg gtaagaacta cctgcaaaat caggaagggt ttgttcatat ttgccggctg	900
	gatacggcgg gcgcacgagt actggaaaac taa	933

35  
 <210> 24  
 <211> 930  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40  
 <220>  
 <223> Polipéptido variante que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa, metA EL

45  
 <400> 24

	atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccg gccgtcaatt tcttgctgta agaaaacgtc	60
50	tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc	120
	cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcccct gctttcaaac	180
	tcacctttgc agtgcgatat tcagctgttg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg	240
55	cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt	300
	gacggtttga ttgtaactgg tgcgcccgtg gaactggtgg agtttaatga tgctcgttac	360
	tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt	420
60	gtctgctggg cggtagcaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc	480
	accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg	540

65

ES 2 833 432 T3

5 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600  
 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660  
 ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720  
 10 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg 780  
 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840  
 ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat 900  
 15 ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa 930

20 <210> 25  
 <211> 930  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Polipéptido variante que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa, metA ET  
 <400> 25

30 atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctgta agaaaacgtc 60  
 tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa gtttctgatc 120  
 cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgcct gctttcaaac 180  
 35 tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacatgatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240  
 cccgcagagc atetgaaaca ettetaetgt aactttgaag atattoagga tcagaacttt 300  
 40 gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg gaaaccgtgg agtttaatga tgcgcttac 360  
 tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420  
 gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc 480  
 45 accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540  
 cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg 600  
 50 ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660  
 ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720  
 caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccg ggatgtaccg 780  
 55 tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840  
 ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat 900  
 60 ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa 930

65 <210> 26  
 <211> 930  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 833 432 T3

<220>

<223> Polipéptido variante que tiene actividad homoserina O-acetiltransferasa, metA EH

5 <400> 26

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc      60
10  tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaatc gtccacttaa ggttctgatc      120
    cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgctcct gctttcaaac      180
    tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcctcgatt cccgtgaatc gcgcaacacg      240
15  cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
    gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg gaacatgtgg agtttaatga tgtcgtttac      360
20  tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt      420
    gtctgctggg cggtagcaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaacctgc      480
    accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
25  cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
    ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat      660
30  ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
    caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg      780
    tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcagagctg gcgtagtcac      840
35  ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatcagat      900
    ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa      930

```

40 <210> 27  
 <211> 2652  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli

45 <220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(2652)  
 <223> fosfoenolpiruvato carboxilasa

50 <400> 27

```

atgaacgaac aatattccgc attgctagt aatgtcagta tgctcggcaa agtgcctggga      60
55  gaaaccatca aggatgcggt gggagaacac attcttgaac gcgtagaaac tatccgtaag      120
    ttgtcgaaat cttcacgcgc tggcaatgat gctaaccgcc aggagttgct caccacctta      180
    caaaatttgt cgaacgacga gctgctgccc gttgcgcgtg cgtttagtca gttcctgaac      240
60  ctggccaaca ccgccgagca ataccacagc atttcgccga aaggcgaagc tgccagcaac      300
    ccggaagtga tcgccgcac cctgcgtaaa ctgaaaaacc agccggaact gagcgaagac      360

```

65

ES 2 833 432 T3

accatcaaaa aagcagtgga atcgctgtcg ctggaactgg tcctcacggc tcaccaacc 420  
 5 gaaattaccg gtcgtacact gatccacaaa atggtggaag tgaacgcctg tttaaaacag 480  
 ctcgataaca aagatatcgc tgactacgaa cacaaccagc tgatgcgtcg cctgcgccag 540  
 ttgatcgccc agtcatggca taccgatgaa atccgtaagc tgcgtccaag cccggtagat 600  
 10 gaagccaaat ggggctttgc cgtagtggaa aacagcctgt ggcaaggcgt accaaattac 660  
 ctgcgcgaaac tgaacgaaca actggaagag aacctcggct acaaactgcc cgtcgaattt 720  
 15 gttccgggcc gttttacttc gtggatgggc ggcgaccgag acggcaacct gaacgtcact 780  
 gccgatatca cccgccacgt cctgctactc agccgctgga aagccaccga tttgttcctg 840  
 aaagatattc aggtgctggt ttctgaactg tcgatgggtg aagcgacccc tgaactgctg 900  
 20 gcgctggttg gcgaagaagg tgccgcagaa ccgtatcgct atctgatgaa aaacctgcgt 960  
 tctcgctga tggcgacaca ggcattggctg gaagcgcgcc tgaaggcga agaactgcca 1020  
 25 aaaccagaag gcctgctgac aaaaaacgaa gaactgtggg aaccgctcta cgcttgctac 1080  
 cagtcacttc aggcgtgtgg catgggtatt atcgccaacg gcgatctgct cgacacctg 1140  
 cgccgcgtga aatgtttcgg cgtaccgctg gtccgtattg atatccgtca ggagagcacg 1200  
 30 cgtcataccg aagcgtggg cgagctgacc cgctacctcg gtatcggcga ctacgaaagc 1260  
 tggtcagagg ccgacaaaca ggcgttcctg atccgcgaac tgaactcaa acgtccgctt 1320  
 35 ctgccgcgca actggcaacc aagcgccgaa acgcgcgaaag tgctcgatac ctgccaggtg 1380  
 attgccgaag caccgcaagg ctccattgcc gcctacgtga tctcgatggc gaaaacgccg 1440  
 tccgacgtac tggctgtcca cctgctgctg aaagaagcgg gtatcgggtt tgcgatgccg 1500  
 40 gttgctccgc tgtttgaaac cctcgatgat ctgaacaacg ccaacgatgt catgaccag 1560  
 ctgctcaata ttgactggtg tcgtggcctg attcagggca aacagatggt gatgattggc 1620  
 tattccgact cagcaaaaga tgcgggagtg atggcagctt cctgggcgca atatcaggca 1680  
 45 caggatgcat taatcaaac ctgcgaaaaa gcgggtattg agctgacgtt gttccacggt 1740  
 cgcggcggtt ccattggtcg cggcggcgca cctgctcatg cggcgtgct gtcacaaccg 1800  
 50 ccaggaagcc tgaaggcgg cctgcgcgta accgaacagg gcgagatgat ccgctttaa 1860  
 tatggtctgc cagaaatcac cgtcagcagc ctgtcgctt ataccggggc gattctggaa 1920  
 gccaacctgc tgccaccgcc ggagccgaaa gagagctggc gtcgcattat ggatgaactg 1980  
 55 tcagtcatct cctgcgatgt ctaccgaggc tacgtacgtg aaaacaaaga tttgtgcct 2040  
 tacttccgct ccgctacgcc ggaacaagaa ctgggcaaac tgccgttggg ttcacgtccg 2100  
 60 gcgaaacgtc gcccaaccgg cggcgtcgag tcaactacgc ccattccgtg gatcttcgcc 2160  
 tggacgcaaa accgtctgat gctccccgcc tggctgggtg caggtacggc gctgcaaaaa 2220

65

ES 2 833 432 T3

	gtggtcgaag acggcaaaca gagcgagctg gaggctatgt gccgcgattg gccattcttc	2280
5	tcgacgcgtc tcggcatgct ggagatggtc ttcgccaag cagacctgtg gctggcggaa	2340
	tactatgacc aacgcctggt agacaaagca ctgtggccgt taggtaaaga gttacgcaac	2400
10	ctgcaagaag aagacatcaa agtgggtgctg gcgattgccca acgattccca tctgatggcc	2460
	gatctgccgt ggattgcaga gtctattcag ctacggaata tttacaccga cccgctgaac	2520
	gtattgcagg ccgagttgct gcaccgctcc cgccaggcag aaaaagaagg ccaggaaccg	2580
15	gatcctcgcg tcgaacaagc gttaatggtc actattgccg ggattgcggc aggtatgcgt	2640
	aataccggct aa	2652

20	<210> 28 <211> 1191 <212> ADN <213> Escherichia coli
25	<220> <221> gen <222> (1)..(1191) <223> aspartato aminotransferasa
30	<400> 28

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 833 432 T3

atgtttgaga acattaccgc cgctcctgcc gacccgattc tgggcctggc cgatctgttt 60  
 5 cgtgccgatg aacgtcccgg caaaattaac ctccgggattg gtgtctataa agatgagacg 120  
 ggcaaaaccc cggtagctgac cagcgtgaaa aaggctgaac agtatctgct cgaaaatgaa 180  
 accaccaaaa attacctcgg cattgacggc atccctgaat ttggtcgtg cactcaggaa 240  
 10 ctgctgtttg gtaaaggtag cgccctgac aatgacaaac gtgctcgac gccacagact 300  
 ccggggggca ctggcgact acgcgtggct gccgatttcc tggcaaaaaa taccagcgtt 360  
 15 aagcgtgtgt gggtagcaa cccaagctgg ccgaaccata agagcgtctt taactctgca 420  
 ggtctggaag ttcgtgaata cgcttattat gatgcgaaa atcacactct tgacttcgat 480  
 gcaactgatta acagcctgaa tgaagctcag gctggcgacg tagtctgtt ccatggctgc 540  
 20 tgccataacc caaccggtat cgaccctacg ctggaacaat ggcaaacact ggcacaactc 600  
 tccgttgaga aaggctggtt accgctgttt gacttcgctt accagggttt tgcccgtggt 660  
 ctggaagaag atgctgaagg actgcgcgct ttcgcggcta tgcataaaga gctgattggt 720  
 25 gccagttcct actctaaaaa ctttggcctg tacaacgagc gtgttggcgc ttgtactctg 780  
 gttgctgccg acagtgaac cgttgatcgc gcattcagcc aatgaaagc ggcgattcgc 840  
 30 gctaactact ctaaccacc agcacacggc gcttctgttg ttgccaccat cctgagcaac 900  
 gatgcgttac gtgcgatttg ggaacaagag ctgactgata tgcgccagcg tattcagcgt 960  
 atgcgtcagt tgttcgtcaa tacgctgcag gaaaaaggcg caaacgcga cttcagcttt 1020  
 35 atcatcaaac agaacggcat gttctccttc agtggcctga caaaagaaca agtgctgcgt 1080  
 ctgcgcgaag agtttggcgt atatgcggtt gcttctggtc gcgtaaatgt ggccgggatg 1140  
 40 acaccagata acatggctcc gctgtgcgaa gcgattgtgg cagtctgta a 1191

45 <210> 29  
 <211> 1104  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli

50 <220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(1104)  
 <223> aspartato-semialdehído deshidrogenasa

<400> 29

55

60

65

ES 2 833 432 T3

atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatggtcg gctccgttct catgcaacgc 60  
 5 atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgcctgtct tctttctac ttctcagctt 120  
 ggccaggctg cgcctcttt tggcggaaacc actggcacac ttcaggatgc ctttgatctg 180  
 10 gaggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa 240  
 atctatccaa agcttcgtga aagcggatgg caaggtact ggattgacgc agcatcgtct 300  
 ctgcgcatga aagatgacgc catcatcatt cttgaccccg tcaatcagga cgtcattacc 360  
 15 gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggta actgtaccgt aagcctgatg 420  
 ttgatgtcgt tgggtggttt attcgcaat gatcttgtg attgggtgtc cgttgcaacc 480  
 taccaggccg cttccggcgg tggcgcgca catatgctg agttattaac ccagatgggc 540  
 20 catctgtatg gccatgtggc agatgaactc gcgaccccg cctctgctat tctcgatata 600  
 gaacgcaaag tcacaacctt aaccgtagc ggtgagctgc cggaggataa ctttggcgtg 660  
 25 ccgctggcgg gtagcctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagccgc 720  
 gaagagtga aagggcaggc ggaaaccaac aagatcctca acacatctc cgtaattccg 780  
 gtagatggtt tatgtgtcgc tgcggggca ttgcgctgcc acagccaggc attcactatt 840  
 30 aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg 900  
 tgggcgaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac ccagctgcc 960  
 35 gttaccggca cgctgaccac gccggtaggc cgctgcgta agctgaatat gggaccagag 1020  
 ttctgtcag cctttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgcgga gccgctcgt 1080  
 cggatgcttc gtcaactggc gtaa 1104

40  
 <210> 30  
 <211> 70  
 <212> **ADN**  
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador

50 <400> 30

ttactctggt gcctgacatt tcaccgacaa agcccaggga acttcatcac gtgtaggctg 60  
 55 gagctgcttc 70

<210> 31  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador

65 <400> 31

ES 2 833 432 T3

	ttacccttg tttgcagccc ggaagccatt ttccaggtcg gcaattaaat catatgaata	60
5	tcctccttag	70
	<210> 32 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10		
	<220> <223> Cebador	
15	<400> 32	
	aaagaatat ccgatcgggt cgggcttagg ctccagtgcc tgttcggtgg gtgtaggctg	60
20	gagctgcttc	70
	<210> 33 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25		
	<220> <223> Cebador	
30	<400> 33	
	agacaaccga catcgctttc aacattggcg accggagccg ggaaggcaaa catatgaata	60
35	tcctccttag	70
	<210> 34 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40		
	<220> <223> Cebador	
45	<400> 34 aattgatc atgccgattc gtgtgccg 29	
50	<210> 35 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<400> 35 aattaagctt ttaatccagc gttggattca tgtg 34	
60	<210> 36 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220>	

<223> Cebador  
 <400> 36  
 5 tgtaactgg tgcgccgctg gaactggtgg ggttaatga tgtc 44  
 <210> 37  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 37  
 15 gacatcata aaccccacca gttccagcgg cgcaccagtt acaa 44  
 <210> 38  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 38  
 25 tgtaactggt gcgccgctgg aacatgtggg gtttaatgat gtcg 44  
 <210> 39  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 39  
 35 cgacatcatt aaaccccaca tgttccagcg gcgcaccagt taca 44  
 <210> 40  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 40  
 45 ttccgaaac gtacctcagc aggtgtaggc tggagctgct tc 42  
 <210> 41  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 41  
 55 gaataaaatt tattcacctg ctgcatatga atacctctct tag 43  
 <210> 42  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 65

<223> Cebador  
 <400> 42  
 aattgatatc atgccgattc gtgtgccgg 29  
 5  
 <210> 43  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 43  
 aattaagcct gctgaggtag gtttcgg 27  
 15  
 <210> 44  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 44  
 cagcaggtag ataaattta ttc 23  
 25  
 <210> 45  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 45  
 cgccaatgga agctgttcc 20  
 35  
 <210> 46  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 46  
 gccggaattc tgtcggatgc gatactgcg c 31  
 45  
 <210> 47  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 47  
 gaaggagctc agaaaaccct cgcgaaaag 30  
 55  
 <210> 48  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60  
 <220>  
 65

<223> Cebador  
 <400> 48  
 gccggagctc tgcggatgc gatactgcg c 31  
 5  
 <210> 49  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 49  
 gaagggtacc agaaaaccct cgcgaaaag 30  
 15  
 <210> 50  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 50  
 tccgagctca taagcgtagc gcatcaggca 30  
 25  
 <210> 51  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 51  
 tccgagctcg tccacctatg ttgactacat 30  
 35  
 <210> 52  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 52  
 ccggaattcc caggagagca ataagca 27  
 45  
 <210> 53  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 53  
 ctagtctaga tgctctattt aactcccg 28  
 60  
 <210> 54  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65  
 <220>

ES 2 833 432 T3

<223> Cebador  
 <400> 54  
 ctagtctaga ccaggagagc aataagca 28  
 5  
 <210> 55  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 55  
 ccggaattct gctctatta actcccg 27  
 15  
 <210> 56  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 56  
 25  
 aggcgctaag gagaccttaa atggctgata caaaagcaaa actcacctc ttaggctgg 60  
 30 agctgcttcg 70  
 <210> 57  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 57  
 40  
 gggttaaaat atttacaact tagcaatcaa ccattaacgc ttgatatcgc atgggaatta 60  
 45 gccatggtcc 70  
 <210> 58  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial Sequence  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 58  
 ctttctata actgcgctc at 22  
 55  
 <210> 59  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Cebador  
 65

<400> 59  
 aggggtatag ctacgccaga a 21

5 <210> 60  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400> 60  
 gaaggcaaat ttaagttcgg 20

15 <210> 61  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 61  
 cgaagcagct ccagcctaca ggtatagata gacgtcattt 40

25 <210> 62  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Cebador

<400> 62  
 cggcgcgctg gcggcgttcg cgcacgactc gctggatggt aa 42

35 <210> 63  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Cebador

<400> 63  
 ttaacatcca gcgagtcgtg cgcgaacgcc gccagcgcgc cg 42

45 <210> 64  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Cebador

<400> 64  
 cgcgttccgc ctgctgtcgg cgatgccgac catggccgcg at 42

55 <210> 65  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <223> Cebador

65 <400> 65

ES 2 833 432 T3

atcgcggcca tggtcggcat cgccgacagc aggcggaacg cg 42

5 <210> 66  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Cebador

<400> 66  
tctgaatat gatgttctcc ggcgctgcg aaccgtatga 40

15 <210> 67  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Cebador

<400> 67  
tcatacgggt cgcacggcgc ggagaacatc atattcagga 40

25 <210> 68  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Cebador

<400> 68  
aatgacgtc tatctatacc tgtaggctgg agctgctcg 40

35 <210> 69  
<211> 76  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Cebador

45 <400> 69

**gcaaaaactaa attattggta tcatgaattt gttgtatgat gaataaaata taggggatgg 60**

**gaattagcca tggccc 76**

50 <210> 70  
<211> 67  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>  
<223> Cebador

60 <400> 70

**ccatggagga ggaattaacc atgcagtggg ggtgggtggg gtgcgataac agctgtatcc 60**

**ccgttga 67**

65

ES 2 833 432 T3

5 <210> 71  
<211> 67  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

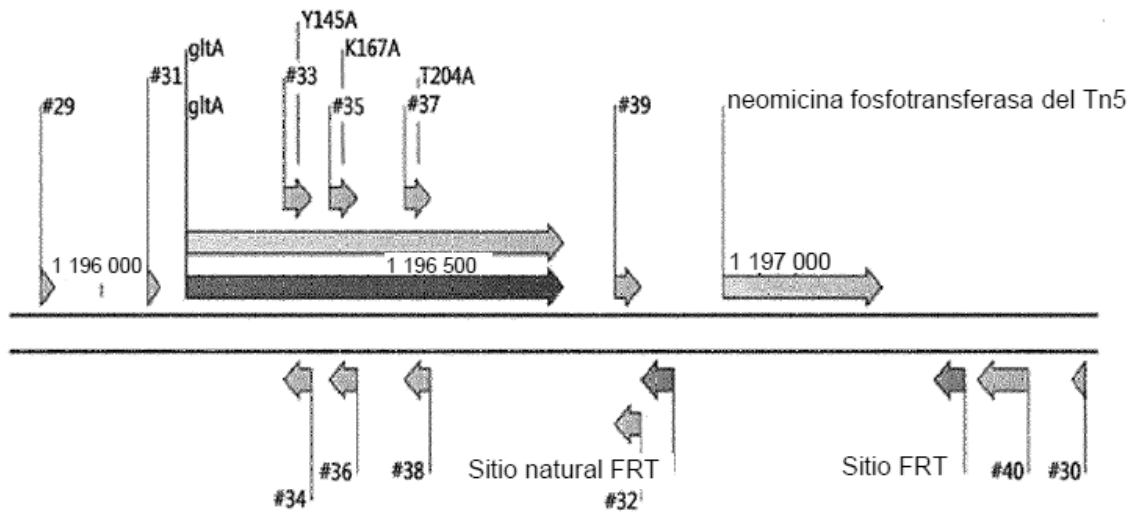
10 <220>  
<223> Cebador  
<400> 71

15 aagcttagga ggaattaacc atgcagtggg ggtgggtggg gtgcgatgca aatttaagtt 60  
ccggcag 67

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un microorganismo de *Escherichia* sp. que produce O-acetil homoserina con mayor capacidad de producción de O-acetil homoserina en comparación con el microorganismo parental que produce O-acetil homoserina, en donde la actividad endógena de la citrato sintasa se modifica para atenuarla o inactivarla en comparación con el microorganismo parental que produce O-acetil homoserina.
- 10 2. El microorganismo de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el microorganismo con la actividad endógena de la citrato sintasa modificada para atenuarla tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 15 3. El microorganismo de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la actividad de cistationina gamma sintasa, homoserina quinasa o ambas se modifica adicionalmente para atenuarla o inactivarla en comparación con sus actividades endógenas.
- 20 4. El microorganismo de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la actividad de la homoserina O-acetiltransferasa se modifica adicionalmente para introducirla o mejorarla, o la homoserina O-succiniltransferasa endógena se modifica adicionalmente para que tenga la actividad de la homoserina O-acetiltransferasa.
- 25 5. El microorganismo de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la actividad de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa y aspartato semialdehído deshidrogenasa se modifica adicionalmente para introducirla o mejorarla.
- 30 6. El microorganismo de *Escherichia* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el microorganismo es *Escherichia coli*.
7. Un método para producir O-acetil homoserina, que comprende:
  - (a) cultivar el microorganismo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6; y
  - (b) recuperar la O-acetil homoserina producida durante el cultivo del microorganismo.

[FIGURA 1]



[FIGURA 2]

