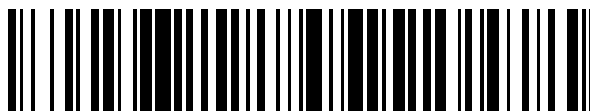


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 830**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 1/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2011 E 11185852 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2444481**

54 Título: **Microorganismo que produce O-fosfoserina y método de producción de L-cisteína o derivados de la misma a partir de O-fosfoserina usando el mismo**

30 Prioridad:

**20.10.2010 KR 20100102664**

**26.08.2011 KR 20110086081**

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

**07.05.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHIN, SOO AN;  
SHIN, YONG UK;  
KIM, HYE WON;  
KIM, SOL;  
UM, HYE WON;  
CHANG, JIN SOOK;  
BAE, HYUN AE;  
JHON, SUNG HOO;  
JO, JAE HYUN;  
SONG, BYEONG CHEOL;  
LEE, KYOUNG MIN y  
YANG, EUN BIN**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

**ES 2 711 830 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-fosfoserina y método de producción de L-cisteína o derivados de la misma a partir de O-fosfoserina usando el mismo

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para la producción de cisteína o sus derivados N-acetilcisteína o S-carboximetilcisteína usando O-fosfoserina como intermedio y a microorganismo recombinante para su uso en la producción de O-fosfoserina.

10

**Antecedentes de la técnica**

La L-cisteína es un aminoácido que desempeña una función importante en el metabolismo del azufre en todos los organismos vivos. Se usa en la biosíntesis de proteínas, tales como queratina del pelo, glutatión, biotina, metionina y otros metabolitos que contienen azufre, y también sirve como precursor de coenzima A. Además, se sabe que la biosíntesis de cisteína está muy asociada con la biosíntesis de otros aminoácidos incluyendo L-serina, L-glicina y L-metionina. Industrialmente, la L-cisteína y sus derivados encuentran aplicaciones en una diversidad de campos incluyendo la industria farmacéutica (para el tratamiento de enfermedades bronquiales), la industria cosmética (en champús para el cabello, composiciones para rizos permanentes) y para la industria alimentaria (antioxidantes, potenciadores del aroma, auxiliares de masa, etc.).

15

20

La L-cisteína se obtuvo una vez de forma industrial por hidrólisis ácida de pelos humanos o plumas de animal (Biotechnology of the Amino Acids Production editado por Ko Aida, pág. 217-223, 1986). Sin embargo, no solamente la producción de cisteína a partir de pelos o plumas asegura un rendimiento tan bajo como de un 7-8 %, sino que también el uso de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico produce un montón de residuos que provocan contaminación ambiental. Además, la extracción de pelos o plumas puede inducir al usuario a tener una fuerte aversión a ello. Estos problemas han causado un empuje del desarrollo de procesos de producción respetuosos con el medio ambiente de L-cisteína. La ruta actual principal implica la fermentación utilizando microorganismos.

25

30

Es representativo entre la producción microbiana de L-cisteína 1) la conversión biológica de D, L-ATC usando un microorganismo (Ryu OH, Ju JY y Shin CS, Process Biochem., 32:201-209, 1997). Este proceso de conversión, sin embargo, es difícil de aplicar industrialmente debido a la baja solubilidad del precursor D, L-ATC. 2) Otro método de producción de L-cisteína es la fermentación directa usando *E. coli* (patente n.º EP0885962B; Wada M y Takagi H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006). La acumulación excesiva de L-cisteína en los microorganismos conlleva toxicidad intracelular, lo que muestra una limitación en la producción de L-cisteína a una alta concentración. Para superar este inconveniente, se emplean proteínas de exportación de L-cisteína, pero no ha habido mejoras significativas en la productividad.

35

40

Con referencia a la ruta de biosíntesis de L-cisteína en microorganismos y plantas, la O-acetil-serina (OAS) actúa como precursor intermedio que proporciona la cadena principal de carbono de L-cisteína (Kredich NM y Tomkins GM, J. Biol. Chem., 241: 4955-4965, 1966). La enzima O-acetilserina sulfhidrilasa (OASS), usando sulfuro de hidrógeno como donador de azufre, cataliza la conversión de O-acetilserina en cisteína. Como alternativa, puede reducirse SO<sub>4</sub> en tiosulfato para su uso como donador de azufre en la producción de cisteína (Nakamura T, Kon Y, Iwahashi H y Eguchi Y, J. Bacteriol., 156: 656-662, 1983). Por lo tanto, puede producirse cisteína usando microorganismos que acumulan OAS y OASS usando diversos donadores de azufre (documento US6 579 705). La ruta de biosíntesis de cisteína mediante OAS usa las dos enzimas de serina acetiltransferasa (CysE), que cataliza la conversión de OAS a partir de serina, y cisteína sintasa (CysK), que cataliza la conversión de OAS en cisteína. Entre ellas, la serina acetiltransferasa (CysE) es muy sensible a la inhibición por retroalimentación por el producto final cisteína (Wada M y Takagi H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006).

50

**Divulgación****[Problema técnico]**

Dando lugar a la presente invención, los autores de la presente invención descubrieron la existencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) en *Aeropyrum pernix*, *Mycobacterium tuberculosis*, y *Trichomonas vaginalis* que toma una ruta específica de O-fosfo-L-serina (OPS), en lugar de la ruta específica de OAS, para sintetizar L-cisteína mediante investigación intensiva (Mino K y Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Burns KE, Baumgart S, Dorrestein PC, Zhai H, McLafferty FW y Begley TP, J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC y Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006) y que la OPSS de *M. tuberculosis*, puede usar Na<sub>2</sub>S como donador de azufre en la conversión de OPS en cisteína incluso en ausencia de enzimas adicionales cuando se retiran cinco restos de aminoácido del extremo C de la misma (Argen D, Schnell R y Schneider G, FEBS Letters, 583: 330-336, 2009). En la presente invención, se muta un microorganismo para que acumule OPS en el mismo, después de la incubación para convertir OPS en cisteína en presencia de la enzima OPSS. No se ha descrito anteriormente nada de este método.

55

60

65

**[Solución técnica]**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para producir cisteína o un derivado de la misma, es decir, N-acetilcisteína o S-carboximetilcisteína.

5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo recombinante para la producción de O-fosfoserina.

**[Efectos ventajosos]**

10 El método de la presente invención en que se produce O-fosfoserina a alto rendimiento mediante un microorganismo recombinante y se usa para la conversión en cisteína, tal como está, es más respetuoso con el medio ambiente y asegura mayor eficacia en la producción de cisteína que los métodos de síntesis química. La cisteína y sus derivados producidos por la fermentación y bioconversión de la presente invención pueden usarse ampliamente en la producción de alimentos y aditivos alimenticios para animales y seres humanos.

**Descripción de los dibujos**

20 La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra la acumulación de O-fosfoserina por fermentación microbiana y la conversión enzimática de la O-fosfoserina acumulada en L-cisteína.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la actividad de OPS sulfhidrilasa de acuerdo con las temperaturas.

La FIG. 3 es un conjunto de gráficos que muestra la sensibilidad al pH de la OPS sulfhidrilasa.

La FIG. 4 es una fotografía que muestra el nivel de expresión de Msm-T en un sistema pET y un sistema pCL-Pcjl analizado por SDS PAGE.

25 La FIG. 5 es un gráfico que muestra la actividad enzimática de OPS sulfhidrilasa para convertir el caldo de fermentación de OPS purificado en cisteína.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra la actividad enzimática de OPS sulfhidrilasa para convertir el caldo de fermentación de OPS en cisteína.

**30 Mejor modo**

Como se usa en este documento, la expresión "conversión de cisteína" pretende referirse a la reacción catalítica de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) que provoca la conversión del sustrato O-fosfoserina (OPS) en el producto cisteína, es decir, se refiere a la reacción catalítica de conversión de OPS en cisteína.

35 Como se usa en este documento, la expresión "tasa de conversión de cisteína" se refiere al porcentaje de la cantidad del producto cisteína respecto a la cantidad de material de partida OPS. En condiciones de reacción óptimas, se convierte 1 mol de OPS en 1 mol de cisteína. Por ejemplo, si se convierten 100 moles de OPS en 100 moles de cisteína, la tasa de conversión de cisteína es del 100 %.

40 De acuerdo con un aspecto de la misma, la presente invención proporciona un método para producir cisteína, que comprende:

45 1) cultivar un microorganismo recombinante que está modificado para tener una actividad fosfoserina fosfatasa (SerB) endógena para producir O-fosfoserina (OPS); y 2) hacer reaccionar la OPS de la etapa 1) con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o con un sulfuro en presencia de un microorganismo que expresa OPSS, para producir cisteína, en el que el nivel de actividad enzimática SerB se reduce usando una técnica seleccionada del grupo que consiste en eliminación del gen cromosómico que codifica la enzima SerB, la introducción de mutación en el gen cromosómico que codifica la enzima SerB para reducir la actividad génica endógena, la sustitución del gen cromosómico que codifica la enzima SerB con un gen mutado para reducir la actividad enzimática endógena, la introducción de mutación en una región reguladora para el gen que codifica la enzima SerB para reducir la actividad génica endógena y la introducción de un oligonucleótido de antisentido complementario a un transcrito del gen que codifica la enzima SerB para inhibir la traducción del ARNm.

55 Además, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un derivado de cisteína N-acetilcisteína o S-carboximetilcisteína, que comprende:

60 1) cultivar un microorganismo recombinante en que se reduce la actividad de fosfoserina fosfatasa (SerB) endógena, para producir O-fosfoserina (OPS);  
2) hacer reaccionar la OPS de la etapa 1) con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o con un sulfuro en presencia de un microorganismo que expresa OPSS, para producir cisteína, y  
3) sintetizar el derivado de cisteína N-acetilcisteína o S-carboximetilcisteína. a partir de la cisteína producida en la etapa 2), en el que el nivel de actividad enzimática SerB se reduce usando una técnica seleccionada del grupo que consiste en eliminación del gen cromosómico que codifica la enzima SerB, la introducción de mutación en el gen cromosómico que codifica la enzima SerB para reducir la actividad génica endógena, la sustitución del gen

cromosómico que codifica la enzima SerB con un gen mutado para reducir la actividad enzimática endógena, la introducción de mutación en una región reguladora para el gen que codifica la enzima SerB para reducir la actividad génica endógena y la introducción de un oligonucleótido de antisentido complementario a un transcrito del gen que codifica la enzima SerB para inhibir la traducción del ARNm.

5 En el método, la etapa 1) se refiere a cultivar un microorganismo recombinante que tiene la actividad de fosfoserina fosfatasa (SerB) endógena reducida.

10 La SerB es una proteína que tiene la actividad de hidrolizar OPS en L-serina. Por tanto, un microorganismo que tenga actividad SerB endógena reducida se caracteriza por la acumulación de OPS en el mismo. La SerB no se limita a ello, puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos, que muestre actividad SerB, y puede tener preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2. Sin embargo, siempre que muestre actividad SerB, se usa cualquier secuencia de aminoácidos, que tiene preferiblemente una homología de un 90 % o mayor, más preferiblemente un 96 % o mayor, mucho más preferiblemente un 98 % o mayor y lo más preferiblemente un 99 % o mayor con la de la SEQ ID NO: 1 o 2. La actividad SerB reducida significa una disminución en la actividad SerB, en comparación con la de una cepa modificada previamente y abarca la alteración de SerB. Se conocen bien en la técnica diversas técnicas para la reducción de la actividad SerB. Ejemplos ilustrativos incluyen la eliminación de una serB cromosómica, la introducción de mutación en *serB* cromosómico para reducir la actividad SerB endógena, la introducción de mutación en una región reguladora para *serB* para reducir la actividad SerB endógena, la sustitución del *serB* cromosómico con un gen mutado para reducir la actividad SerB endógena y la introducción de un oligonucleótido de antisentido complementario a un transcrito del *serB* para inhibir la traducción del ARNm, pero los métodos para reducir la actividad SerB no se limitan a estos. Estas técnicas pueden aplicarse a la reducción de la actividad de otras enzimas en la presente invención.

25 La alteración de SerB endógena provoca la introducción de auxotrofia de serina en el microorganismo recombinante de modo que el medio debe complementarse con glicina o serina. La glicina puede proporcionarse en forma de glicina purificada, un extracto de levadura que contiene glicina o triptona. La glicina está contenida a una concentración de 0,1 a 10 g/l, y preferiblemente a una concentración de 0,5 a 3 g/l. En cuanto a la serina, puede proporcionarse en forma de serina purificada, un extracto de levadura que contiene serina o triptona. Su concentración en el medio de cultivo varía de 0,1 a 5 g/l, y preferiblemente de 0,1 a 1 g/l.

30 Como se divulga en este documento, cuando se cultiva en un medio que contiene glicina o serina, *Corynebacterium glutamicum* mutante o *E. coli* en que se ha alterado la actividad de SerB endógena se encontraba que producía una mayor cantidad de OPS, en comparación con el tipo silvestre (véanse la tablas 2, 3, 6 y 7).

35 Además, el microorganismo recombinante de la presente invención puede tener actividad fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA) o fosfoserina aminotransferasa (SerC) potenciada. La SerA es una proteína que tiene la actividad de convertir 3-fosfoglicerato en 3-fosfohidroxipiruvato. La SerA puede tener aminoácidos de tipo silvestre o una secuencia de aminoácidos mutante que muestra resistencia a inhibición por retroalimentación por serina, pero no se limita a estas. Preferiblemente, la SerA puede tener una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 7. Siempre que muestre actividad SerA de tipo silvestre o la actividad SerA mutante resistente a inhibición por retroalimentación de serina, puede usarse cualquier secuencias de aminoácidos, aunque comparte preferiblemente una homología de un 90 % o mayor, más preferiblemente un 96 % o mayor, mucho más preferiblemente un 98 % o mayor y lo más preferiblemente un 99 % o mayor con la de una de las SEQ ID NO: 3 a 7. Una "SerA mutante resistente a inhibición por retroalimentación" significa el mutante que muestra una actividad SerA mantenida o potenciada independientemente de la inhibición por retroalimentación por serina o glicina. Los mutantes resistentes a retroalimentación son bien conocidos en la técnica (Grant GA et al., J. Biol. Chem., 39: 5357-5361, 1999; Grant GA et al., Biochem., 39: 7316-7319, 2000; Grant GA et al., J. Biol. Chem., 276: 17844-17850, 2001; Peters-Wendisch P et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 60: 437-441, 2002; documento EP0943687B). En una realización de la presente invención, cuando se introducía un *serA* resistente a retroalimentación en la misma, se encontró que *Corynebacterium glutamicum* o *E. coli* que tienen una *serB* alterada producía una cantidad mayor de OPS, en comparación con el tipo silvestre (véanse las tablas 4 y 9).

55 La SerC es una proteína que tiene la actividad de convertir 3-fosfohidroxipiruvato en O-fosfoserina. La SerC no se limita a ello, puede comprender las secuencias que muestran actividad SerC y puede tener preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. Sin embargo, siempre que muestre actividad SerC, puede emplearse cualquier secuencia de aminoácidos, pero debe compartir preferiblemente una homología de un 90 % o mayor, más preferiblemente un 96 % o mayor, mucho más preferiblemente un 98 % o mayor y lo más preferentemente un 99 % o mayor con la de la SEQ ID NO: 8. Además, puede introducirse una mutación en el *serC* de modo que la actividad enzimática pueda aumentarse. En una realización de la presente invención, cuando un *serC* se introducía adicionalmente en la misma, se encontró que *Corynebacterium glutamicum* o *E. coli* que tienen un *serB* y un *serA* resistente a retroalimentación producía una cantidad mayor de OPS, en comparación con el tipo silvestre (véase la tabla 9).

65 Además, la capacidad del microorganismo recombinante de la presente invención de realizar la captación intracelular o la degradación de O-fosfoserina puede disminuirse. En detalle, el microorganismo recombinante puede

modificarse para reducir la actividad del transportador ABC de alquilfosfonato PhnC/PhnD/PhnE (operón PhnCDE, es decir, componente de unión a ATP del transporte de fosfonato (PhnC; EG 10713)-componente de proteína de unión periplásmica del transportador Pn (PhnD; EG 10714)-componente de membrana integral del transportador ABC de alquilfosfonato (PhnE; EG 11283)), fosfatasa alcalina (PhoA) o fosfatasa ácida (AphA).

5 En una realización de la presente invención, se observó que la eliminación adicional del operón phnCDE del mutante recombinante daba lugar a un aumento en la producción de OPS (tabla 10). En el microorganismo recombinante que tenía alterado además la actividad PhoA o AphA, la degradación de OPS comenzaba a disminuir en el tiempo cuando se disminuía la concentración de ácido fosfórico en el medio de cultivo (tabla 12). Además, la introducción de *serA* o *serC* resistentes a retroalimentación aumentaba la producción de OPS (tablas 14 a 16).

15 Además, el microorganismo recombinante de la presente invención puede caracterizarse además por la potenciación de la actividad transhidrogenasa de nucleótido de pirimidina (PntAB; EC 1.6.1.1). Como se describe previamente (Sauer U P et al., J Biol Chem. 20; 279(8):6613-9. Epub 2003), PntAB participa en el metabolismo de NADPH para regular el equilibrio de oxidorreducción intracelular. En una realización de la presente invención, el microorganismo recombinante en que la actividad PntAB se potenció adicionalmente por sobreexpresión de *pntAB*, se encontró que aumentaba la producción de OPS (tabla 17).

20 Además, el microorganismo recombinante de la presente invención puede caracterizarse por la potenciación de la permeasa del flujo de O-acetilserina/cisteína (YfiK), proteína de flujo de homoserina/homoserina lactona (RhtB; EG 11469) o proteína de flujo de treonina/homoserina lactona (RhtC; EG11468). La YfiK se conoce como un exportador para exportar cisteína y OAS de forma extracelular (Franke I et al., J. Bacteriology, 185: 1161-1166, 2003) y se informa de que RhtB actúa como exportador extracelular de homoserina/homoserina lactona, un precursor de treonina. Además, la RhtC se conoce como un exportador de treonina y homoserina. La potenciación de la actividad de YfiK, RhtC y RhtB mostró un aumento en el crecimiento y producción de OPS de la cepa de acumulación de OPS (tabla 18).

30 La potenciación de la actividad enzimática puede conseguirse usando diversos métodos bien conocidos incluyendo, aunque sin limitación, aumento del número de copias de un gen que codifica una enzima de interés, introducción de una mutación en una región reguladora para el gen para potenciar la actividad enzimática, sustitución del gen cromosómico con un gen mutado para potenciar la actividad enzimática e introducción de una mutación en el gen cromosómico para potenciar la actividad enzimática.

35 Además, el microorganismo recombinante de la presente invención se caracteriza además por la actividad reducida de fosfoglicerato mutasa. La fosfoglicerato mutasa existe como tres isoenzimas: Gpml, GpmA y GpmB y es responsable de la conversión de 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato en el proceso de glucólisis. Para el uso de 3-fosfoglicerato como sustrato, estas enzimas compiten con SerA, que cataliza la síntesis de 3-fosfohidroxipiruvato. Por lo tanto, se observó que la disminución de la actividad de cada una de las enzimas causaba una abundancia de 3-fosfoglicerato, un precursor de OPS, que provoca la producción de un nivel aumentado de OPS (tabla 19).

40 En el microorganismo recombinante de la presente invención, también puede reducirse la L-serina deshidratasa I (SdaA; EC 4.3.1.17) o 2-amino-3-cetobutirato coenzima A ligasa (Kbl). Por tanto, el microorganismo recombinante se caracteriza por la producción de OPS mantenida o aumentada incluso cuando se cultiva en un medio que contiene una baja concentración de glicina o serina (tabla 20).

45 Además, el microorganismo recombinante de la presente invención puede caracterizarse además por la actividad reducida de lclR. lclR es un factor de transcripción que funciona reprimiendo la expresión de aceBAK, un operón de derivación de glioxilato (L Gui et al., J. Bacteriol., vol. 178, N.º 1, 321-324, 1996). Cuando se eliminaba, se observaba que la producción de OPS aumentaba (tabla 21).

50 Además, el microorganismo recombinante de la presente invención puede caracterizarse además por la potenciación de una actividad enzimática seleccionada del grupo que consiste en i) acetil-CoA sintetasa (Acs), ii) ácido acético cinasa (AckA)-fosfotransacetilasa (Pta), iii) malato sintasa G (GlcB), iv) malato deshidrogenasa (MaeB), v) glutamato deshidrogenasa (GdhA), vi) glioxilato carboligasa (Glc), vii) tartronato semialdehído reductasa 2 (GlxR), viii) glicerato cinasa II (GlxK) y una combinación de las mismas.

55 En una realización concreta de la presente invención, cuando i) Acs (EC N.º 6.2.1.1; J Bacteriol. mayo de 1995; 177(10):2878-86) o monómero de piruvato oxidasa (PoxB; EC 1.2.2.2) o ii) AckA y Pta (EC 2,3,1,8), todas con el objetivo de reutilizar de forma eficaz el acetato acumulado con el consumo concomitante de NADH producido, se potenciaban adicionalmente, se encontró que el microorganismo recombinante de la presente invención aumentaba la producción de OPS (tabla 22). Al funcionar catalizando la síntesis de malato a partir de glioxalato y la conversión de malato en piruvato, iii) GlcB (EC N.º 2.3.3.9) y iv) MaeB (EC 1.1.137) pueden debilitar el ciclo de TCA y, por tanto, usarse para aumentar el consumo de glucosa y la producción de O-fosfoserina (tabla 23). De acuerdo con una realización de la presente invención, la potenciación de v) GdhA; (EC 1.4.1.2), que cataliza la síntesis de glutamato, un sustrato de SerC, a partir de 2-oxoglutarato y NADPH, otorga un potencial mucho mayor para la producción de OPS en el microorganismo (tabla 17). Todos de vi) Glc(EC 4.1.1.47), vii) GlxR(EC 1.1.1.60) y viii) GlxK(EC 2.7.1.31)

se conocen por convertir glucoxilato en 3-fosfoglicerato, es decir, aumentar el nivel del sustrato de fosfoglicerato deshidrogenasa (Kim HJ et al., J. Bacteriol., 186(11), 3453-3460, 2004; Eva Cusa et al., J. Bacteriol., 181(24), 7479-7484, 1999; Chnag YY et al., J. Biol. Chem. 268(6): 3911-3919, 1993). El microorganismo recombinante de la presente invención, cuando se potenciaba adicionalmente en la actividad de Glc, GlxR y GlxK, estaba mejorado en el consumo de azúcar y el crecimiento (tabla 24).

El microorganismo recombinante de la presente invención se refiere a cualquier microorganismo en que haya la reducción de actividad SerB, produciendo de este modo OPS a un nivel elevado. Si se satisface esta condición, cualquier microorganismo, sea procariota o eucariota, está dentro del alcance de la presente invención. Son representativos entre ellos las enterobacterias o bacterias corineformes. Ejemplos de los microorganismos útiles en la presente invención incluyen *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp. y *Brevibacterium* sp. Son preferibles *Escherichia* sp. y *Corynebacterium* sp, con más preferencia dada para *Escherichia* sp. y con la máxima preferencia dada para *E. coli*.

En una realización, la cepa recombinante que puede producir OPS se llamó *E. coli* CA07-0012, y se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms, ubicado en 361-221, Hongje 1, Seodaemun, Seúl, Corea, el 12 de octubre de 2011 con el número de acceso KCCM11212P.

Además, en una realización, la cepa recombinante que puede producir OPS se llamó *E. coli* CA07-0022/pCL-prmf-serA\*(G336V)-serC, y se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms, ubicado en 361-221, Hongje 1, Seodaemun, Seúl, Corea, el 28 de septiembre de 2010 con el número de acceso KCCM11103P. En este documento, el término "CA07-0022/pCL-prmf-serA\*(G336V)-serC" se usa indistintamente con CA07-0022 serA\*(G336V)/pCL-prmf-serA\*(G336V)-serC.

Después de cultivar la cepa durante 80 horas en un fermentador de 1 l, se produjo O-fosfoserina a una concentración de 19,5 g/l (ejemplo 35).

Como se usa en este documento, el término "cultivar" pretende indicar el cultivo de microorganismos en condiciones controladas de forma artificial. Un procedimiento de cultivo puede realizarse usando un medio adecuado y condiciones de cultivo bien conocidas en la técnica. Los expertos en la materia pueden controlar fácilmente el procedimiento de cultivo para que corresponda a las cepas empleadas. Por ejemplo, puede realizarse en un tipo discontinuo, en un tipo continuo o en un tipo semicontinuo, pero no se limita a ellos.

Además, el medio de cultivo contiene una fuente de carbono. Ejemplos de la fuente de carbono incluyen sacáridos y carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa, aceites y grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco, ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estas fuentes de carbono pueden estar presentes en solitario o en combinación en el medio de cultivo. Como fuente de nitrógeno, un material orgánico tal como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, destilado del macerado del maíz, soja y proteína de trigo, o un compuesto de nitrógeno inorgánico tal como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio puede estar contenido en el medio de cultivo. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse en solitario o en combinación. El medio puede contener dihidrogenofosfato de potasio, fosfato de potasio o sales de sodio correspondientes como fuentes de fósforo. El medio puede contener sales metálicas tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. El medio de cultivo también puede contener aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados. Los nutrientes pueden añadirse de una manera discontinua o de una manera continua al medio.

Un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico puede añadirse de una manera adecuada al medio de cultivo durante el cultivo para ajustar el pH del cultivo. Además, durante el cultivo, se usa un agente desespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso para suprimir la formación de espuma. Además, para mantener el medio de cultivo en una condición aeróbica, puede inyectarse oxígeno o gas que contiene oxígeno al menos de cultivo. Para una condición anaeróbica o microaeróbica, se proporciona nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono sin aireación. El medio de cultivo puede mantenerse típicamente a una temperatura de 27 °C a 37 °C y preferiblemente de una temperatura de 30 °C a 35 °C. En cuanto al periodo de cultivo, puede mantenerse hasta que el producto de interés se obtiene en una cantidad deseada, y preferiblemente varía de 10 a 100 horas.

Para la recogida y recuperación adicional de la OPS producida durante la etapa de cultivo del medio de cultivo, puede seleccionarse un método adecuado bien conocido en la técnica dependiendo del tipo de cultivo, que es cultivo discontinuo, continuo o semicontinuo.

En el método de la presente invención, la etapa 2) aborda la reacción de la OPS de la etapa 1) con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS, para inducir la conversión de O-fosfoserina en cisteína o sus derivados.

El sulfuro puede proporcionarse en una forma líquida o gaseosa, así como en una forma sólida típicamente usada en

la técnica, a causa de la diferencia en el pH, presión y/o solubilidad. Siempre que puede convertirse en un grupo tiol (SH), puede usarse cualquier compuesto de azufre tal como sulfuro ( $S^{2-}$ ) o tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) en la presente invención. Preferiblemente, puede usarse  $Na_2S$ , NaSH,  $H_2S$ ,  $(NH_4)_2S$ , NaSH y  $Na_2S_2O_3$ , todos los cuales pueden proporcionar un grupo tiol para OPS. En la reacción, se suministra un grupo tiol a una molécula de OPS para producir una molécula de cisteína o un derivado de la misma. En esta conversión enzimática, puede añadirse preferiblemente un sulfuro a una concentración molar de 0,1 a 3 veces y más preferiblemente de 1 a 2 veces tan alta como la de OPS usada. A la luz de la economía, se usa mucho más preferiblemente un sulfuro que proporciona grupo tiol y OPS a una relación molar de 1:1. En una realización de la presente invención, se usó  $Na_2S$  como fuente de azufre. Se añadió  $Na_2S$  a una concentración molar de 1 a 3 veces tan alta como la de OPS usada en la reacción de conversión. Preferiblemente, se suministró una concentración molar dos veces tan alta como la de OPS para convertir de forma eficaz OPS en cisteína (tabla 34).

Como se usa en este documento, la expresión "O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS)" se refiere a una enzima que cataliza la transferencia de un grupo tiol (SH) a OPS (O-fosfoserina) para convertir OPS en cisteína. La enzima se encontró por primera vez en *Aeropyrum pernix*, *Mycobacterium tuberculosis*, y *Trichomonas vaginalis* (Mino K y Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Burns KE et al., J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005).

Como se usa en este documento, el término "mutante" se refiere a un cultivo o un individuo que muestra una alteración hereditaria o no hereditaria en el fenotipo. Cuando se usa junto con OPSS, el término "mutante" pretende indicar una enzima OPSS que está genéticamente alterada de modo que su actividad puede potenciarse de forma eficaz, en comparación con el tipo silvestre.

En la presente invención, la OPSS mutante puede construirse eliminando, sustituyendo o añadiendo una parte de una secuencia nucleotídica que codifica OPSS. De acuerdo con una realización de la presente invención, una enzima OPSS con actividad potenciada se preparó eliminando cinco restos de aminoácido del extremo C de la enzima OPSS de *Mycobacterium smegmatis*.

La OPSS mutante puede obtenerse en *E. coli*, usada ampliamente para la expresión de enzimas, usando técnicas de síntesis génica basadas en optimización de codones por la que pueden obtenerse enzimas de interés a alto rendimiento. Como alternativa, pueden usarse métodos de cribado de fuentes de enzimas útiles basados en bioinformática de cantidades masivas de información genética sobre microorganismos para obtener la OPSS mutante. En una realización de la presente invención, se seleccionaron enzimas OPSS que utilizan OPS como sustrato para sintetizar cisteína de diversos microbios cribando la homología de secuencias de aminoácidos. A este respecto, se lisaron sedimentos celulares obtenidos usando un medio y condiciones de cultivo que eran adecuados en la técnica, seguido de la purificación del sobrenadante que contenía la enzima para producir la enzima OPSS (tabla 26).

Además, se desarrolló un sistema de expresión de alto rendimiento para obtener la enzima OPSS económicamente. Se conoce bien en la técnica un vector pET que emplea un promotor T7. Sin embargo, los autores de la presente invención desarrollaron un sistema de expresión de enzimas, llamado el sistema CJ1 (patente coreana 10-0620092 B1), en lugar de emplear el sistema típico. En una realización de la presente invención, los niveles de expresión de OPSS entre un sistema pET que comprende un promotor T7 y el sistema CJ1 que comprende un promotor CJ1 se compararon dadas las mismas condiciones. Como resultado, el sistema CJ1 mostró un nivel de expresión mayor de OPSS que el sistema pET. Además, la sobreexpresión de OPSS requería una baja temperatura (18 °C) y un largo periodo de tiempo en el sistema pET, pero una alta temperatura (37 °C) y un corto periodo de tiempo en el sistema pCL-pCJ1. Preferiblemente, el sistema pCL-pCJ1 se usa para obtener OPSS (ejemplo 46).

La potenciación de la actividad enzimática puede conseguirse usando diversos métodos bien conocidos. Por ejemplo, puede realizarse aumentando el número de copias de un gen que codifica OPSS, usando un promotor fuerte o introduciendo una mutación genética.

La optimización de la conversión enzimática de OPSS puede conseguirse usando diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la optimización puede basarse en una comprensión completa de las características de OPSS, tales como la temperatura y pH óptimos, la inhibición contra sustratos, concentración de sustrato, estabilidad térmica, etc. Además, la optimización puede determinarse mediante condiciones óptimas para la conversión enzimática, tal como la concentración óptima de OPSS, los equilibrios óptimos de los sustratos usados en términos de concentraciones, una preferencia por compuestos de azufre que proporcionan SH para la conversión enzimática, una preferencia por determinados tampones, la influencia de iones generados y cofactores y sus concentraciones óptimas.

En una realización de la presente invención, la enzima OPSS obtenida usando el método mencionado anteriormente se caracterizó y basándose en las características determinadas, se desarrolló un proceso de conversión enzimática económicamente beneficioso que tenía una alta tasa de conversión de cisteína a partir de OPS, con la garantía de estabilidad enzimática. En el proceso de conversión enzimática, la temperatura de la reacción puede establecerse de 37 °C a 80 °C. En detalle, Ape-OPSS (SEQ ID NO: 12), que pertenece a arqueobacterias, muestra actividad enzimática aumentada a 60 °C en comparación con 37 °C, y la propia enzima es muy estable al calor, con

reactividad óptima a 60 °C. Por otro lado, Msm-T (SEQ ID NO: 10) muestra actividad óptima a 37 °C y está exenta de la actividad para tratamiento térmico a 60 °C. Se observó que la enzima OPSS tiene actividad enzimática sobre un intervalo de pH de 6,0 a 10,0. Ape-OPSS mostró actividad óptima a pH 7,4. Con la aparición de actividad óptima a un pH de 8,0 a 9,0, Msm-T mostró estabilidad sobre un intervalo de pH más amplio, en comparación con Ape-OPSS (tablas 28 y 31, y FIGS. 2 y 3).

Como cofactor, puede usarse PLP (piridoxal-5'-fosfato) 0,001 - 2 mM o DTT 0,001 - 100 mM en la conversión enzimática. En una realización de la presente invención, la tasa de conversión de cisteína se aumentaba 2,3 veces en presencia de DTT 25 mM o PLP 0,2 mM. Por tanto, el tratamiento con DTT o PLP consigue una mejora en la tasa de conversión de cisteína de la etapa 2). La adición del cofactor se estableció a un nivel razonable considerando el coste de producción aumentado y la tasa de conversión aumentada (tabla 30).

Las condiciones de reacción para OPSS pueden variar dependiendo de los tipos y concentración de la OPS usada. En una realización de la presente invención, se usó OPS pura (disponible en el mercado), OPS purificada del cultivo preparado en la etapa 1) y el cultivo que contiene OPS de la etapa 1) en diversas condiciones para proporcionar las tasas de conversión óptimas. Como resultado, la tasa de conversión de cisteína varió dependiendo del tipo y concentración de OPSS y la temperatura de reacción y el tipo y concentración de OPS (FIG. 5 y 6, y tabla 35).

El método de la presente invención puede comprender además el aislamiento y purificación de la cisteína producida en la etapa 2). Después de la conversión enzimática, la cisteína puede aislarse y purificarse del medio de cultivo usando un método bien conocido en la técnica.

Los expertos en la materia pueden sintetizar químicamente derivados de cisteína a partir de cisteína usando un método bien conocido. La cisteína puede hacerse reaccionar fácilmente con un agente de acetilación para dar NAC (N-acetilcisteína) y con ácido aloacético en condiciones básicas para dar SCMC (S-carboximetilcisteína). Estos derivados de cisteína se usan como materiales en medicinas que tratan catarros, bronquitis, asma bronquial y garganta irritada.

En la presente invención, el caldo de OPS obtenido mediante fermentación microbiana se usa como sustrato para sintetizar cisteína. El caldo de OPS obtenido por fermentación microbiana tiene ventajas económicas sobre OPS pura disponible en el mercado porque el caldo de OPS puede usarse sin tener que purificarse adicionalmente y el cofactor PLP necesario para la conversión puede obtenerse del cultivo fermentado.

En una realización de la presente invención, se desarrolló un proceso de conversión que asegura una tasa de conversión de cisteína tan elevada como de un 80 % cuando se usaba 50 µg/ml de Msm-T en condiciones de reacción de un caldo de OPS 50 mM o un caldo de OPS purificada 60 mM, Na<sub>2</sub>S 100 mM o Na<sub>2</sub>S 120 mM, y PLP 0,2 mM. Debe apreciarse por los expertos en la materia que la conversión enzimática usando enzimas muy activas puede optimizarse fácilmente y aumentarse de escala.

De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante que tiene actividad reducida de SerB para la producción de OPS. En una realización, el microorganismo recombinante muestra una potenciación de serA o serC resistente a retroalimentación por serina o eliminación de al menos una seleccionada entre transportador ABC de alquilfosfonato PhnC/PhnD/PhnE (operón phnCDE), fosfatasa alcalina (phoA) y fosfatasa ácida (aphA). Preferiblemente, los microorganismos recombinantes para la producción de OPS son el microorganismo depositado con el n.º de acceso KCCM11103P o KCCM11212P. Más preferiblemente, el microorganismo recombinante para la producción de OPS es el microorganismo depositado con el n.º de acceso KCCM11103P.

#### Modo para la invención

Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención mediante los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no se deben interpretar como limitantes de la presente invención.

#### <Preparación de *Corynebacterium* productora de O-fosfoserina y producción de O-fosfoserina usando la misma>

##### EJEMPLO 1: Preparación de cepa de *Corynebacterium* deficiente para fosfoserina fosfatasa (serB)

Se modificó *Corynebacterium glutamicum* 13032 eliminando el gen de serB (SEQ ID NO: 13, EC 3.1.3.3) que codifica fosfoserina fosfatasa, que cataliza la síntesis de L-serina a partir de O-fosfoserina, mediante la misma. Para este fin, se construyó un fragmento para la inactivación de serB. A este respecto, se diseñaron cebadores para la preparación de la cepa recombinante 13032-ΔserB de la presente invención. En primer lugar, se obtuvo la secuencia de serB de *Corynebacterium glutamicum* 13032 con referencia a los datos del NIH GenBank, y se sintetizaron los cebadores de las SEQ ID NO: 22 a 27 basándose en la secuencia de serB. Para la alteración génica específica de sitio, se empleó un vector pDC que no puede replicarse en *Corynebacterium glutamicum*. Se construyó un plásmido pDC-ΔserB en que la pauta abierta de lectura de serB estaba alterada internamente y se adoptó para la preparación



de una eliminación génica de serB específica de sitio en la cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum*. La alteración génica interna del pDC- $\Delta$ serB se generó por PCR cruzada usando los pares de cebadores de las SEQ ID NO: 22 y 23 y de las SEQ ID NO: 24 y 25, con el ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 que sirve como molde, e introducción del producto de PCR en un vector pDC. El plásmido recombinante resultante se transformó en *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre por electroporación (van der Rest et al. 1999). El plásmido se introdujo en el cromosoma por recombinación primaria (cruce), seguida de recombinación secundaria (cruce) para escindir la serB original del cromosoma.

Después de completarse la recombinación secundaria, los transformantes de *Corynebacterium glutamicum* que contenían la mutación de eliminación de serB se analizaron por PCR diagnóstica usando un par de cebadores específicos de gen de las SEQ ID NO: 26 y 27. La cepa recombinante se llamó CB01-0047.

#### EJEMPLO 2: Ensayo para la productividad de O-fosfoserina en la cepa de *Corynebacterium* deficiente para fosfoserina fosfatasa

La cepa mutante CB01-0047, resultante de la eliminación de serB de *Corynebacterium glutamicum* 13032, que se había previsto que acumularía O-fosfoserina, se propagó sobre placas BHIS y se incubó durante la noche en una incubadora a 30 °C. Después de ello, las colonias que aparecieron en las placas BHIS se inocularon en 25 ml de un medio de valoración mostrado en la tabla 1 usando un inóculo de platino y después se incubaron a 30 °C durante 48 horas con agitación a 200 rpm. Los resultados se resumen en la tabla 2, a continuación.

[Tabla 1]

Composición del medio principal	
Composición	Cantidad (por litro)
Glucosa	100 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	45 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,2 g
HSM	20 g
Oligoelementos	20 ml
Carbonato de calcio	30 g
pH	7,2
Oligoelementos	
Composición	Cantidad (por litro)
Biotina	0,09 g
Tiamina	0,45 g
Pantonato de Ca	0,45 g
NCA	3 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	9 g
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	9 g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,045 g
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,045 g

[Tabla 2]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
<i>C. glutamicum</i> 13032	25	100	0,02
CB01-0047	6,5	23	0,07

Se observó que la cepa CB01-0047 crecía muy lentamente en el medio de valoración. Este retardo del crecimiento no se mejoró incluso tras la adición de un complemento de L-glicina. Sin embargo, el crecimiento se aumentó en

presencia de L-serina, pero se observó un ligero aumento en la producción de O-fosfofoserina en comparación con el tipo silvestre. Los resultados se resumen en la tabla 3, a continuación.

[Tabla 3]

Cepa	A.A. (aminoácidos) añadidos	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfofoserina (g/l)
CB01-0047	-	6,3	21	0,09
	L-glicina	6,9	22	0,09
	L-serina	24,5	100	0,05

5 **EJEMPLO 3: Construcción de gen de fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA\*) mutado derivado de *Corynebacterium***

10 Los genes derivados de *Corynebacterium glutamicum* serA\*(E235K) (SEQ ID NO: 14) y serA\*(197Δ) (SEQ ID NO: 15) se construyeron, que codifican mutantes respectivos de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, una enzima que cataliza la síntesis de 3-fosfohidroxipiruvato a partir de 3-fosfoglicerato. Los mutantes se presentaron como resistentes a retroalimentación (FBR) de serina (Peters-Wendisch P et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 60: 437-441, 2002; documento EP0943687B). serA\*(E235K) se obtuvo por PCR de unión sobre el ADN genómico de ATCC13032 usando los cebadores de las SEQ ID NO: 28 a 31 mientras que serA\*(197Δ) se construyó por PCR usando pares de cebadores de las SEQ ID NO: 28 a 32. Los productos de PCR así obtenidos se insertaron en vectores T respectivos para construir vectores recombinantes llamados Tblunt-serA\*(E235K) y Tblunt-serA\*(197Δ). Posteriormente, los dos vectores se trataron con las enzimas de restricción EcoRV y XbaI para dar dos fragmentos de ADN serA\*(E235K) y serA\*(197Δ). Estos fragmentos se insertaron en los vectores respectivos pECCG117-Pcj7-GFP-terminador que se han digerido con las mismas enzimas de restricción. Como resultado, se obtuvieron dos vectores recombinantes pECCG117-Pcj7-serA\*(E235K) y pECCG117-Pcj7-serA\*(197Δ).

25 **EJEMPLO 4: Preparación de cepa de *Corynebacterium* que sobreexpresa serA\* y ensayo para la productividad de O-fosfofoserina**

30 Los dos plásmidos FBR-serA\* derivados de *Corynebacterium* construidos en el ejemplo 3 se introdujeron en *Corynebacterium glutamicum* CB01-0047. Para evaluar la productividad de O-fosfofoserina, los transformantes se propagaron sobre placas BHIS y se incubaron durante una noche a 30 °C. Después de ello, las colonias que aparecieron en las placas BHIS se inocularon en 25 ml de un medio de valoración mostrado en la tabla 1 que contenía adicionalmente 2 g/l de L-serina usando un inóculo de platino y después se incubaron a 30 °C durante 48 horas con agitación a 200 rpm. Los resultados se resumen en la tabla 4, a continuación.

[Tabla 4]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfofoserina (g/l)
CB01-0047/pECCG117	24,5	100	0,03
CB01-0047/pECCG117-Pcj7-serA* (E235K)	25,3	100	0,3
CB01-0047/pECCG117-Pcj7-serA* (197Δ)	24,3	100	0,28

35 En las cepas de *Corynebacterium glutamicum* transformadas con el FBR-serA\* derivado de *Corynebacterium*, como se muestra en la tabla 4, se observaron acumulaciones de O-fosfofoserina a una concentración de 0,1 a 0,3 g/l.

**<Preparación de *E. coli* que produce O-fosfofoserina y producción de O-fosfofoserina usando la misma>**

40 **EJEMPLO 5: Preparación de cepa de *E. coli* que tiene la actividad reducida de fosfofoserina fosfatasa (SerB)**

45 Se modificó *E. coli* eliminando el gen de serB (SEQ ID NO: 16) que codifica fosfofoserina fosfatasa, que cataliza la síntesis de L-serina a partir de O-fosfofoserina, mediante la misma. EL mutante de eliminación *E. coli* K12 se preparó usando el método de inactivación de una etapa (Datsenko KA y Wanner BL, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 6640-6645, 2000) para eliminar un gen marcador resistente a antibiótico. Para preparar la cepa de eliminación de serB, en primer lugar, se realizó PCR en un plásmido pKD3 (Datsenko KA y Wanner BL, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 6640-6645, 2000; GenBank n.º AY048742) usando un par de cebadores de las SEQ ID NO: 33 y 34. El producto de PCR se introdujo en células competentes de *E. coli* K12 que contenían pKD46 (Datsenko KA y Wanner BL, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 6640-6645, 2000; GenBank n.º AY048746) por electroporación. Después de ello, las cepas que mostraron resistencia a cloranfenicol se sometieron a PCR para confirmar la eliminación de serB, y después se transformaron con pCP20 (Datsenko KA y Wanner BL, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 6640-6645, 2000) para eliminar el marcador resistente a antibiótico. La cepa mutante resultante se llamó CA07-0012.

Además, el codón de inicio de *serB* se modificó para reducir la actividad fosfoserina fosfatasa de la siguiente manera. El gen de *serB* de tipo silvestre con ATG como codón de inicio se obtuvo por PCR con el ADN genómico de *E. coli* W3110 que sirvió como molde. Se construyó una *serB* mutante con CTG como codón de inicio por PCR de unión. Se usó un par de cebadores de las SEQ ID NO: 35 y 36 en la PCR para amplificar la *serB* de tipo silvestre mientras que se emplearon los pares de cebadores de las SEQ ID NO: 37 a 38 para amplificación por PCR de la *serB* mutante. Los productos de PCR se trataron con *HindIII* y se clonaron en pccBAC1 (epicentro) en el sitio de restricción de *HindIII* para construir pccBAC1-Pself-ATG-*serB* y pccBAC1-Pself-CTG-*serB*, respectivamente. El vector de *serB* de tipo silvestre y el mutante se introdujeron en CA07-0012 para comparar la actividad fosfoserina fosfatasa.

#### EJEMPLO 6: Ensayo de cepa que tiene la actividad reducida de *SerB* para la productividad de O-fosfoserina

La cepa mutante deficiente de fosfoserina fosfatasa CA07-0012 que se había previsto que acumularía O-fosfoserina, se propagó sobre placas BHIS y se incubó durante la noche en una incubadora a 33 °C. Después de ello, las colonias que aparecieron en las placas BHIS se inocularon en 25 ml de un medio de valoración mostrado en la tabla 5 usando un inóculo de platino y después se incubaron a 33 °C durante 48 horas con agitación a 200 rpm. Los resultados se resumen en la tabla 6, a continuación.

[Tabla 5]

Composición	Cantidad (por litro)
Glucosa	40 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 mg
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	10 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 mg
Extracto de levadura	2 g
Carbonato de calcio	30 g
pH	6,8

[Tabla 6]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
<i>E. coli</i> W3110	16	40	0,03
CA07-0012	9,8	16	0,5
CA07-0012 / pccBAC1-Pself-ATG- <i>serB</i>	20	40	0
CA07-0012 / pccBAC-Pself-CTG- <i>serB</i>	15	40	0,7

Para potenciar el crecimiento y productividad de O-fosfoserina del mismo, se cultivó CA07-0012 durante 48 horas en el medio de valoración de la tabla 5 que contenía adicionalmente 1 g/l L-glicina. Los resultados se resumen en la tabla 7, a continuación.

[Tabla 7]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
<i>E. coli</i> W3110	16	40	0,03
CA07-0012	18	40	1,5

Como se muestra en la tabla 7, la adición de L-glicina al medio de cultivo permitió que la cepa aumentara la tasa de crecimiento y la productividad de O-fosfoserina.

#### EJEMPLO 7: Construcción del vector que alberga el gen de fosfoglicerato deshidrogenasa (*SerA*\*) mutado derivado de *E. coli*

Se construyeron los genes derivados de *E. coli* serA\* (G336V) (SEQ ID NO: 18), serA\* (G336V, G337V) (SEQ ID NO: 19) y serA\* (G336V, R338G) (SEQ ID NO: 20) que codifican mutantes respectivos de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, una enzima que cataliza la síntesis de 3-fosfohidroxipiruvato a partir de 3-fosfoglicerato. Los mutantes se presentaron como resistentes a retroalimentación (FBR) de serina (Grant GA, Xu XL y Hu Z, Biochem., 39: 7316-7319, 2000; Grant GA, Hu Z y Xu XL, J. Biol. Chem., 276: 17844-17850, 2001). La introducción de los genes mutantes en el cromosoma de *E. coli* se realizó usando el método de PCR de unión. Los fragmentos de ADN que contenían mutaciones se prepararon usando los siguientes cebadores.

Los cebadores de las SEQ ID NO: 39 y 41 se usaron habitualmente en el gen SerA\*. Para introducir mutaciones en el gen de serA, se realizó PCR con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 42 y 43 para serA\* (G336V), con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 44 y 45 para serA\*(G336V, G337V), y con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 46 y 47 para serA\* (G336V, R338G). Los cebadores se sintetizaron basándose en la información acerca del gen K12 W3110 (número de acceso a GenBank AP 003471) y sus secuencias nucleotídicas adyacentes, registradas en el NIH GenBank.

#### **EJEMPLO 8: Clonación de gen serA derivado de *E. coli*, gen serA\* Gene y gen de 3-fosfoserina aminotransferasa (serC)**

Se clonaron serA(SEQ ID NO: 17, EC 1.1.1.95), serC(SEQ ID NO: 21, EC 2.6.1.52), serA\*(G336V), serA\*(G336V, G337V) y serA\*(G336V, R338G) de la siguiente manera. Se obtuvieron serA y serC realizando PCR sobre el ADN genómico de *E. coli* W3110 mientras que serA\*(G336V), serA\*(G336V, G337V), y serA\*(G336V, R338G) se construyeron por PCR con los fragmentos de ADN del ejemplo 7 que sirven como moldes. Los cebadores de PCR fueron las SEQ ID NO: 48 y 49 para serA y las SEQ ID NO: 50 y 51 para serC. Después del tratamiento con EcoRV y HindIII, los productos de la PCR se clonaron en el vector recombinante pCL-Prmf, construido por inserción del promotor rmf de *E. coli* en el vector pCL1920 (GenBank n.º AB236930) para producir vectores recombinantes respectivos llamados pCL-Prmf-serA, pCL-Prmf-serC, pCL-Prmf-serA\*(G336V), pCL-Prmf-serA\*(G336V, G337V) y pCL-Prmf-serA\*(G336V, R338V), respectivamente.

Además, se construyeron los plásmidos en que serA, uno de los tres mutantes de serA, y/o serC forman un operón, es decir, pCL-Prmf-serA-(RBS)serC, pCL-Prmf-serA\*(G336V)-(RBS)serC, pCL-Prmf-serA\*(G336V, G337V)-(RBS)serC y pCL-Prmf-serA\*(G336V, R338V)-(RBS)serC. A este respecto, se obtuvo un fragmento (RBS)serC usando los cebadores de las SEQ ID NO: 51 y 52 y se clonó en un sitio HindIII en pCL-Prmf-serA, pCL-Prmf-serA\*(G336V), pCL-Prmf-serA\*(G336V, G337V) y pCL-Prmf-serA\*(G336V, R338V).

#### **EJEMPLO 9: Preparación de cepas de serA, serA\* y serC potenciadas derivadas de *E. coli* y ensayo para la productividad de O-fosfoserina**

Los ocho plásmidos construidos en el ejemplo 8 se transformaron en CA07-0012 y las cepas recombinantes resultantes se ensayaron para la productividad de O-fosfoserina. Cada cepa se propagó sobre placas LB y se incubó durante la noche a 33 °C. Después de ello, las colonias que aparecieron en las placas LB se inocularon en 25 ml de medio de valoración de la tabla 8 y se cultivaron a 33 °C durante 48 horas con agitación a 200 rpm. Los resultados se resumen en la tabla 9, a continuación.

[Tabla 8]

Composición	Cantidad (por litro)
Glucosa	40 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 mg
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	10 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 mg
L-glicina	2,5 g
Triptona	2 g
Extracto de levadura	2 g
Carbonato de calcio	30 g
pH	6,8

[Tabla 9]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoferina (g/l)
CA07-0012	23	40	1,7
CA07-0012 / pCL-Prmf-serA	25	40	1,8
CA07-0012 / pCL-Prmf-serA* (G336V)	23	37	2,2
CA07-0012 / pCL-Prmf-serA*(G336V,G337V)	21	36	2,1
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V, R338V)	22	37	2,2
CA07-0012/pCL-Prmf-serA-(RBS) serC	20	35	2,1
CA07-0012/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS) serC	18	31	2,5
CA07-0012 / pCL-Prmf-serA*(G336V,G337V)-(RBS) serC	-17	32	2,5
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V, R338V)-(RBS) serC	16	30	2,6

Como es evidente a partir de los datos de la tabla 9, la cepa de *E. coli* CA07-0012 aumentó en la productividad de O-fosfoferina cuando se transformaba con serA, y la productividad de O-fosfoferina se aumentaba a un grado mayor tras la introducción de uno de los tres mutantes serA\*. Las cepas en que serA, o uno de los tres mutantes serA\* y serC se activaron simultáneamente, mostraban mayor productividad de O-fosfoferina de lo que lo hacían cuando había una única actividad de serA o serA\*. La máxima productividad de O-fosfoferina se detectó en una cepa en que se activó simultáneamente el mutante serA\* y serC.

#### 10 EJEMPLO 10: Preparación de cepa de *E. coli* deficiente del transportador ABC de alquilfosfonato PhnC/PhnD/PhnE (operón phnCDE)

En *E. coli*, se informó de que el transportador ABC de alquilfosfonato PhnC/PhnD/PhnE trasladaba la O-fosfoferina al citoplasma (Wanner BL y Metcalf WW. FEMS Microbiol. Lett., 15:133-139, 1992). El operón phnCDE que codifica una proteína transportadora ABC de alquilfosfonato PhnC/PhnD/PhnE se eliminó de una cepa de eliminación de serB para preparar la cepa CA07-0016. Para la eliminación de phnCDE, se empleó un par de cebadores de las SEQ ID NO: 53 y 54. La eliminación se realizó de una manera similar a la del ejemplo 5.

Además, se introdujo pCL-Prmf-serA\*(G336V)-(RBS)serC, construido en el ejemplo 8, en CA07-0016.

#### 20 EJEMPLO 11: Ensayo de cepa de *E. coli* deficiente de operón phnCDE para la productividad de O-fosfoferina

Las cepas CA07-0016 y CA07-0016/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-(RBS)serC, preparado en el ejemplo 10, se evaluaron para la productividad de O-fosfoferina. Cada cepa se propagó sobre placas LB o placas de LB (espectinomycin) y se incubó durante la noche a 33 °C. Después de ello, las colonias que aparecieron en las placas LB o las placas LB (espectinomycin) se inocularon en 25 ml de medio de valoración de la tabla 8 usando un inóculo de platino y se cultivaron a 33 °C durante 48 horas con agitación a 200 rpm. Los resultados se resumen en la tabla 10, a continuación.

[Tabla 10]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoferina (g/l)
CA07-0012	22	40	1,8
CA07-0016	23	38	2,0
CA07-0012/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	21	35	2,1
CA07-0016/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS) serC	20	40	2,4

Como se observa en la tabla 10, la cepa de eliminación del operón phnCDE mostró únicamente un ligero aumento en la productividad de O-fosfoferina.

#### 35 EJEMPLO 12: Preparación de cepa de *E. coli* deficiente de fosfatasa alcalina (phoA), fosfatasa ácida (aphA)

La cepa de *E. coli* de eliminación de fosfoferina fosfatasa se eliminó adicionalmente del gen phoA que codifica fosfatasa alcalina y el gen aphA que codifica fosfatasa ácida. Se obtuvo un fragmento de ADN para su uso en la eliminación de phoA realizando PCR en un plásmido pKD3 con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 55 y 56. Por otro lado, se obtuvo un fragmento de ADN para uso en la eliminación de aphA usando un par de cebadores de las

5 SEQ ID NO: 57 y 58 de la misma manera. Cada cepa de eliminación se preparó de la misma manera que en el ejemplo 5. La cepa que eliminó tanto *phoA* como *aphA* se preparó por electroporación del fragmento de ADN para la eliminación de *aphA* en una célula competente de la cepa de eliminación de *phoA* que se había transformado de nuevo con pKD46. Después de ello, los transformantes que eran resistente a cloranfenicol se sometieron a PCR para confirmar la eliminación de *aphA*, y después se transformaron con pCP20 para eliminar el marcador resistente a antibiótico. Las cepas mutantes resultantes y sus genotipos se resumen en la tabla 11, a continuación.

[Tabla 11]

Cepa	Genotipo
CA07-0013	W3110 $\Delta$ serB $\Delta$ phoA
CA07-0015	W3110 $\Delta$ serB $\Delta$ aphA
CA07-0018	W3110 $\Delta$ serB $\Delta$ phoA $\Delta$ aphA

10 A cada cepa de eliminación, el pCL-Prmf-serA\*(G336V)-(RBS)serC, construido en el ejemplo 8, se introdujo de la misma manera que en el ejemplo 10.

15 **EJEMPLO 13: Ensayo de cepa de *E. coli* deficiente de fosfatasa alcalina (*phoA*), fosfatasa ácida (*aphA*) para la capacidad de degradar O-fosfoserina**

15 Las cepas preparadas en el ejemplo 12 se ensayaron para la productividad de OPS y la incapacidad de degradar OPS. Cada cepa se propagó sobre placas LB o placas LB (espectinomycin) y se incubó durante la noche a 33 °C. Después de ello, las colonias que aparecieron en las placas LB o las placas LB (espectinomycin) se inocularon en 25 ml de medio de valoración de la tabla 8 usando un inóculo de platino y se cultivaron a 33 °C durante 72 horas con agitación a 200 rpm. Los resultados se resumen en la tabla 12, a continuación. Se evaluó la incapacidad de degradar OPS mediante un cambio en el nivel de iones fosfato determinado por el análisis de iones fosfato.

[Tabla 12]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoserina (g/l)	PO4 (ppm)
CA07-0012	23	40	0,3	692
CA07-0013	22	40	1,6	459
CA07-0015	7,4	25	0	1098
CA07-0018	19	40	1,7	487
CA07-0012/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS)serC	20	40	0,1	714
CA07-0013/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS) serC	16	40	1,8	385
CA07-0018/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS)serC	17	40	1,6	593

25 Como se observa en la tabla 12, la cepa de eliminación de *aphA* mostró un fenómeno de crecimiento anómalo mientras que las cepas que carecían de *phoA* o tanto de *phoA* como de *aphA* aumentaban algo su productividad de O-fosfoserina y disminuían su capacidad de degradar O-fosfoserina. Por otro lado, la cepa en que no se eliminó ni *phoA* ni *aphA* degradaba la O-fosfoserina acumulada durante 72 horas, con el aumento concomitante del nivel de PO<sub>4</sub>.

30 **EJEMPLO 14: Preparación de cepas deficientes de operón *phnCDE*, *phoA* y *aphA***

35 La cepa deficiente de *serB* (CA07-0012) se modificó para eliminar adicionalmente *phnCDE* que codifica el transportador ABC de alquilfosfonato *phnC/phnD/phnE*, *phoA* que codifica fosfatasa alcalina y *aphA* que codifica fosfatasa ácida. Las cepas así preparadas se proporcionan en la tabla 13, a continuación. Se empleó el método de inactivación de una etapa descrito en el ejemplo 5 para preparar los mutantes de eliminación.

[Tabla 13]

Cepa	Genotipo
CA07-0020	W3110 $\Delta$ serB $\Delta$ phoA $\Delta$ phnCDE
CA07-0022	W3110 $\Delta$ serB $\Delta$ phoA $\Delta$ aphA $\Delta$ phnCDE

En cada una de las cepas de eliminación, el pCL-Prmf-serA\*(G336V)-(RBS)serC, construido en el ejemplo 8, se introdujo de la misma manera que en el ejemplo 10.

**EJEMPLO 15: Ensayo de cepas de *E. coli* deficientes de operón phnCDE, phoA y aphA para productividad de O-fosfoserina**

Las cepas preparadas en el ejemplo 14 se ensayaron para la productividad de OPS. Cada cepa se propagó sobre placas LB o placas LB (espectinomicina) y se incubó durante la noche a 33 °C. Después de ello, las colonias que aparecieron en las placas LB o las placas LB (espectinomicina) se inocularon en 25 ml de medio de valoración de la tabla 8 usando un inóculo de platino y se cultivaron a 33 °C durante 72 horas con agitación a 200 rpm. Los resultados se resumen en la tabla 14, a continuación.

[Tabla 14]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoserina (g/l)	PO <sub>4</sub> (ppm)
CA07-0012	23	40	0,3	692
CA07-0020	18,3	40	1,9	262
CA07-0022	19,1	40	2	263
CA07-0012/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS) serC	20	40	0,1	714
CA07-0020/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS)serC	17,6	40	2,5	174
CA07-0022/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS)serC	17	40	2,6	218

Se descubrió que CA07-0020 y CA07-0022 tenían productividad de OPS aumentada y capacidad disminuida de degradar O-fosfoserina, en comparación con CA07-0012. Esta propiedad también se detectó en las cepas transformadas adicionalmente con pCL-Prmf-serA\* (G336V)-(RBS)serC.

**EJEMPLO 16: Preparación de mutantes de *E. coli* deficientes de operón phnCDE, genes phoA y aphA y que tienen sustitución de fosfoglicerato deshidrogenasa (serA\*)**

En CA07-0022, se sustituyó serA que codifica 3-fosfoglicerato deshidrogenasa con serA\*(G336V), serA\*(G336V, G337V) o serA\*(G336V, R338G), que todas se presentan con resistencia por retroalimentación de serina, en el cromosoma, del siguiente modo. Para introducir mutaciones en el gen de serA en el cromosoma, se construyeron vectores de la siguiente manera. Se realizó PCR con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 40 y 41 en serA\* (G336V), serA\*(G336V, G337V) y serA\*(G336V, R338G), preparados en el ejemplo 7. Después del tratamiento tanto con SacI como con BamHI, los productos de PCR así obtenidos se clonaron en pSG76C en el sitio SacI y BamHI. El vector recombinante resultante se transformó en *E. coli* BW que entonces se propagó sobre placas LB. Las colonias que aparecieron en las placas se sometieron a secuenciación de bases, y se seleccionaron los transformantes en que se introdujeron mutaciones. De ellos, se prepararon plásmidos usando un método de minipreparación típico. De acuerdo con las mutaciones introducidas, los plásmidos se llamaron pSG76C-serA\*(G336V), pSG76C-serA\*(G336V, G337V) y pSG76C-serA\*(G336V, R338G).

Cada uno de los mutantes de *E. coli* se preparó como se describe previamente (Posfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z y Blattner FR, Nucleic Acids Res. 27: 4409-4415, 1999) y se eliminó el gen marcador resistente a antibiótico de los mismos. Para preparar el mutante serA\*(G336V), se introdujo pSG76C-serA\*(G336V) en una célula competente de CA07-0022 por electroporación. Las cepas resistentes a cloranfenicol se sometieron a PCR para confirmar la introducción de serA\* (G336V). La cepa se transformó con pST76-ASceP (Posfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z y Blattner FR, Nucleic Acids Res. 27: 4409-4415, 1999) para eliminar el gen marcador resistente a antibiótico. La cepa resultante se llamó CA07-0022 serA\*(G336V). La cepa CA07-0022 serA\*(G336V) se transformó con pSG76C-serA\*(G336V, G337V) y pSG76C-serA\*(G336V, R338G) de una manera similar para proporcionar los mutantes serA\*(G336V, G337V) y serA\*(G336V, R338G), llamados CA07-0022 serA\*(G336V, G337V) y serA\* (G336V, R338G), respectivamente.

**EJEMPLO 17: Ensayo de mutantes de *E. coli* deficientes de operón phnCDE, genes aphA y aphA y que tiene sustitución de fosfoglicerato deshidrogenasa (serA\*) para la productividad de O-fosfoserina**

Las cepas preparadas en el ejemplo 16 se ensayaron para la productividad de O-fosfoserina. Cada cepa se propagó sobre placas LB o placas LB (espectinomicina) y se incubó durante la noche a 33 °C. Después de ello, las colonias que aparecieron en las placas LB o las placas LB (espectinomicina) se inocularon en 25 ml de medio de valoración de la tabla 8 usando un inóculo de platino y se cultivaron a 33 °C durante 48 horas con agitación a 200 rpm. Los

resultados se resumen en la tabla 15, a continuación.

[Tabla 15]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0022	22	40	2,2
CA07-0022 serA*(G336V)	21	35	2,7
CA07-0022 serA*(G336V, G337V)	20	36	2,8
CA07-0022 serA*(G336V, R338G)	20	38	2,7

- 5 Las cepas en que se había alterado serA para genes resistentes a retroalimentación de serina mostraron tasas de crecimiento algo disminuidas, pero un aumento en la productividad de O-fosfoserina.

**EJEMPLO 18: Preparación de cepas de *E. coli* mutantes deficientes de operón phnCDE, phoA y aphA y que tienen fosfoglicerato deshidrogenasa (serA\*) sustituida y 3-fosfoserina aminotransferasa potenciada y ensayo para la productividad de O-fosfoserina**

En las cepas preparadas en el ejemplo 16, es decir, CA07-0022 serA\*(G336V), CA07-0022 serA\* (G336V, G337V) y CA07-0022 serA\* (G336V, R338G), se introdujeron en el plásmido preparado en el ejemplo 8, es decir, pCL-Prmf-serC. Los mutantes resultantes se evaluaron para la productividad de O-fosfoserina de la misma manera que en el ejemplo 9. Los resultados se resumen en la tabla 16, a continuación.

[Tabla 16]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0022 / pCL-Prmf-serC	20	38	2,9
CA07-0022 serA*(G336V) / pCL-Prmf-serC	19,5	34	3,45
CA07-0022 serA*(G336V, G337V) / pCL-Prmf-serC	20	33	3,55
CA07-0022 serA*(G336V, R338G) / pCL-Prmf-serC	19	35	3,6

Como se observa en la tabla 16, se descubrió que las cepas de serC activadas estaban mejoradas en la productividad de O-fosfoserina. Este fenómeno fue más evidente en la cepa en que se modificó serA en un gen resistente a retroalimentación de serina.

**EJEMPLO 19: Cepa de nucleótido de pirimidina transhidrogenasa (pntAB) potenciada y construcción de vector que contiene glutamato deshidrogenasa (gdhA)**

Para preparar una cepa en que pntAB que codifica la transhidrogenasa de nucleótidos de pirimidina esté regulado por aumento, se cargó el promotor pntAB con un promotor trc usando un sistema loxP mutante (Arakawa H *et al.*, BMC Biotechnol. 1: 7, 2001). A este respecto, se realizó PCR en el plásmido pmlox-trc (ref) usando un par de cebadores de las SEQ ID NO: 59 y 60 y el producto de PCR así obtenido se introdujo en una células competente de CA07-0022 serA\*(G336V) de anclaje a pKD46 por electroporación. Los transformantes que mostraron resistencia a cloranfenicol se sometieron a PCR para confirmar el remplazo del promotor, seguido de transformación con pJW168 (Le Borgne S *et al.*, Methods Mol Biol. 267: 135-43, 2004) para eliminar el gen marcador resistente a antibiótico. La cepa resultante se llamó CA07-0022 serA\*(G336V) P(trc)-pntAB. Los cebadores usados para la PCR se diseñaron basándose en la información acerca del gen K12 W3110 (número de acceso a GenBank AP002223, AP002224) y sus secuencias nucleotídicas adyacentes, registradas en el NHI GenBank.

El gen de gdhA que codifica glutamato deshidrogenasa se amplificó usando PCR con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 61 y 62 para dar un único polinucleótido. Los dos cebadores de las SEQ ID NO: 61 y 62 tienen el sitio para la enzima de restricción *HindIII*. Los cebadores se diseñaron basándose en la información acerca del gen K12 W3110 (número de acceso a GenBank AP 002380) y sus secuencias nucleotídicas adyacentes, registradas en el NHI GenBank.

La PCR empezó con la desnaturalización a 94 °C durante 3 min y continuó con 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 56 °C durante 30 s y prolongación a 72 °C durante 2 min, seguido de prolongación a 72 °C durante 7 min. Como resultado, se obtuvo un polinucleótido de 1714 pb de longitud. Después del tratamiento con *HindIII*, el producto de PCR se clonó en pCC1BAC y el sitio *HindIII* y se introdujo en *E. coli* DH5 $\alpha$  que después se propagó sobre placas LB. La secuenciación de bases permitió la selección de las colonias desarrolladas que no tenían mutaciones en su gen gdhA. El plásmido se aisló usando un método de minipreparación típico y se llamó pCC1BAC-P(nativo)-gdhA.



**EJEMPLO 20: Introducción de pntAB y gdhA en cepa productora de OPS y ensayo para la productividad de OPS**

Para preparar una cepa productora de OPS en que estuvieran regulados por aumento pntAB y gdhA, la cepa CA07-0022 serA\*(G336V) o la cepa CA07-0022 serA\*(G336V) P(trc)-pntAB se transformó con pCL-P(trc)-serA\*(G336V)-serC y pCC1BAC-P(nativo)-gdhA individualmente o en combinación, como se muestra en la siguiente tabla. Cada transformante se incubó durante la noche a 33 °C en placas LB. Las colonias se inocularon en 25 ml de medio de valoración de la tabla 8 usando un inóculo de platino y se cultivaron a 33 °C durante 48 horas con agitación a 200 r.p.m.

[Tabla 17]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	OPS (g/l)
CA07-0022 serA* (G336V) /pCL-P(trc)-serA*(G336V)-serC	20	37	3,1
CA07-0022 serA*(G336V) P(trc)-pntAB /pCL-P(trc)-serA*(G336V)-serC	19	35	3,4
CA07-0022 serA* (G336V) P(trc)-pntAB /pCC1BAC-P(nativo)-gdhA	7,2	11	0,2
CA07-0022 serA*(G336V) P (trc)-pntAB /pCC1BAC-P(nativo)-gdhA /pCL-P(trc)-serA*(G336V)-serC	27,0	40	3,95

Como se observa en la tabla 17, la cepa se mejoró en la productividad de O-fosfoserina cuando pntAB estaba regulado por aumento en la misma. La regulación por aumento tanto de pntAB como de gdhA consiguió un aumento mayor en la productividad de O-fosfoserina, en comparación con el control. Por tanto, se entiende que pntAB y gdhA desempeñan una función importante en la producción de OPS.

**EJEMPLO 21: Construcción de vectores que portan genes que codifican O-acetilserina/proteína de flujo de cisteína (ydeD) de *E. coli*, permeasa de flujo de O-acetilserina/cisteína (yfiK), proteína de flujo de homoserina/homoserina lactona (rhtB), proteína de flujo de treonina/homoserina (rhtC), transportador de arsenito/antimonio (asrB) y subunidad de transporte de leucina/isoleucina/valina (livHM)**

La liberación de la O-fosfoserina producida de la célula requiere un factor de exportación adecuado, ninguno de los cuales, sin embargo, se ha presentado previamente. En este contexto, seis genes, es decir, ydeD que codifica proteína de flujo de O-acetilserina/cisteína, yfiK que codifica permeasa de flujo de O-acetilserina/cisteína (Franke I, Resch A, Dassler T, Maier T y Bock A, J. Bacteriology, 185: 1161-166, 2003), rhtB que codifica proteína de flujo de homoserina/homoserina lactona, RhtC que codifica proteína de flujo de treonina/homoserina, asrB que codifica transportador de arsenito/antimonio y livHM que codifica subunidad transportadora de leucina/isoleucina/valina se seleccionaron entre la diversidad previamente presentada de genes transportadores, y se clonaron y evaluaron.

Cada gen se obtuvo realizando PCR en el ADN genómico de *E. coli* W3110, con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 63 y 64 para ydeD, con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 65 y 66 para yfiK, con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 67 y 68 para rhtB, con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 69 y 70 para rhtC, con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 71 y 72 para asrB y con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 73 y 74 para livHM. Después del tratamiento con EcoRV y HindIII, cada uno de los productos de PCR así obtenidos se clonó en el sitio EcoRV y HindIII en el pCL-Prmf-GFP, para dar vectores recombinantes, llamados pCL-Prmf-ydeD, pCL-Prmf-yfiK, pCL-Prmf-rhtB, pCL-Prmf-rhtC, pCL-Prmf-asrB y pCL-Prmf-livHM.

**EJEMPLO 22: Introducción de vectores que portan genes que codifican ydeD, yfiK, rhtB, rhtC, asrB, livHM de *E. coli* en cepas productora de O-fosfoserina y ensayo para la productividad de O-fosfoserina**

La cepa CA07-0022 serA\*(G336V) se transformó con los seis plásmidos construidos en el ejemplo 21 y se evaluó para la productividad de O-fosfoserina de la misma manera que en el ejemplo 9. Los resultados se dan en la Tabla 18, a continuación.

[Tabla 18]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0022 serA* (G336V)	22,1	37,7	2,5
CA07-0022 serA* (G336V) /pCL-Prmf-ydeD	7,4	22,3	0,69
CA07-0022 serA* (G336V) /pCL-Prmf-yfiK	21	40	2,55
CA07-0022 serA* (G336V) /pCL-Prmf-rhtB	23	40	2,8
CA07-0022 serA* (G336V) /pCL-Prmf-rhtC	22,5	40	2,75
CA07-0022 serA* (G336V) /pCL-Prmf-asrB	21	38	2,4
CA07-0022 serA* (G336V) /pCL-Prmf-livHM	8	23	0,8

Como se muestra en la tabla 18, las cepas transformadas con ydeD, mdtG o livHM mostraban tasa de crecimiento disminuida y productividad de OPS disminuida mientras que la transformación con yfiK, rhtB o rhtC aumentaba la tasa de crecimiento y la productividad de OPS (tabla 18).

#### 5 EJEMPLO 23: Preparación de cepa deficiente de fosfoglicerato mutasa (gpml, gpmA y gpmB)

gpml, gpmA y gpmB, que codifican cada uno fosfoglicerato mutasa, se eliminaron únicamente o en combinación de CA07-0022 serA\*(G336V) para producir las cepas mutantes llamadas CA07-0022 serA\*(G336V) $\Delta$ gpml, CA07-0022 serA\*(G336V) $\Delta$ gpmA, CA07-0022 serA\*(G336V) $\Delta$ gpmB, CA07-0022 serA\*(G336V) $\Delta$ gpml $\Delta$ gpmA, CA07-0022 serA\*(G336V) $\Delta$ gpmA $\Delta$ gpmB, y CA07-0022 serA\*(G336V) $\Delta$ gpml $\Delta$ gpmA $\Delta$ gpmB, respectivamente. Las cepas de eliminación gpmA- y gpmB- se prepararon de una manera similar a la del ejemplo 5, usando un par de cebadores de las SEQ ID NO: 75 y 76 para gpmA y un par de cebadores de las SEQ ID NO: 81 y 82 para gpmB. Para la construcción de una cepa de eliminación de gpml, como se describe en el ejemplo 16, se introdujo una mutación de gpml que contenía un codón de parada usando pSG76C. Un mutante de gpml que contenía un codón de parada se amplificó por PCR de unión usando los cebadores de las SEQ ID NO: 77 a 81, con el ADN genómico de K12 W3110 que sirve como molde, y se clonó en pSG76 en el sitio *SacI/BamHI*.

#### EJEMPLO 24: Ensayo de cepas deficientes de gpml, gpmA y gpmB para la productividad de OPS

Las cepas preparadas en el ejemplo 23 se evaluaron para la productividad de OPS de la misma manera que en el ejemplo 9. Los resultados se resumen en la tabla 19, a continuación.

[Tabla19]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	OPS (g/l)
CA07-0022 serA* (G336V)	23	40	2,4
CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ gpml	22	38	2,5
CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ gpmA	20	34	2,8
CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ gpmB	20	34	2,7
CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ gpml $\Delta$ gpmA	19	32	2,6
CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ gpmA $\Delta$ gpmB	21	35	3,3

Como puede observarse en la tabla 19, cuando cada uno de gpml, gpmA y gpmB se eliminaba y los otros no se eliminaban, el consumo de azúcar de las cepas mutantes disminuía, pero su productividad de OPS aumentaba, en comparación con la cepa madre. Particularmente, la cepa desprovista tanto de gpmA como de gpmB tenía un consumo de azúcar similar, pero productividad de OPS aumentada, en comparación con las cepas desprovistas de gpmA o gpmB. Por lo tanto, se entiende que la eliminación de gpml, gpmA y gpmB produce una cantidad aumentada de 3-fosfoglicerato, un precursor de OPS, dando lugar por tanto a producción de OPS aumentada.

#### EJEMPLO 25: Preparación de cepas deficientes de 2-amino-3-cetobutirato CoA ligasa (kbl), L-serina desaminasa I (sdaA)

El gen kbl que codifica 2-amino-3-cetobutirato CoA ligasa y el gen sdaA que codifica L-serina desaminasa I se eliminaron de CA07-0022 serA\*(G336V) para producir CA07-0022 serA\*(G336V)  $\Delta$ kbl y CA07-0022 serA\*(G336V)  $\Delta$ sdaA, respectivamente. Las cepas de eliminación kbl- y sdaA- se prepararon de una manera similar a la del ejemplo 5, usando un par de cebadores de las SEQ ID NO: 83 y 84 para kbl y un par de cebadores de las SEQ ID NO: 85 y 86 para sdaA.

#### EJEMPLO 26: Ensayo para la DO y consumo de azúcar de cepas deficientes de kbl/sdaA de acuerdo con la concentración de glicina

Las cepas preparadas en el ejemplo 25 se evaluaron para la DO, el consumo de azúcar y la productividad de O-fosfoserina cuando se incubaban en las mismas condiciones de medio como se describe en la tabla 8 del ejemplo 9, con la excepción de que se usó glicina en una cantidad de 0 a 2,5 g/l.

[Tabla 20]

Concentración de glicina (g/l)	Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	OPS (g/l)
0	CA07-0022 serA* (G336V)	8	10	0,7
	CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ kbl	7	8	0,7
	CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ sda A	9	10	0,7
1	CA07-0022 serA* (G336V)	15	30	1,5

Concentración de glicina (g/l)	Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	OPS (g/l)
	CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ kbl	14	28	1,2
	CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ sda A	22	39	2,4
2	CA07-0022 serA* (G336V)	19	35	2,1
	CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ kbl	17	32	1,7
	CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ sda A	23	40	2,5
2,5	CA07-0022 serA* (G336V)	22	38	2,5
	CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ kbl	23	39	2,7
	CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ sda A	24	40	2,3

Como puede observarse en la tabla 20, la DO y la tasa de consumo de azúcar en las tres cepas aumentaba cuando el nivel de glicina en el medio se aumentaba. Particularmente, la cepa de eliminación sdaA- mostraba un aumento significativo en la DO y en la tasa de consumo de azúcar a una concentración de glicina de 1 g/l. La productividad de OPS de la cepa de eliminación de kbl mejoró enormemente en presencia de 2,5 g/l de glicina.

**EJEMPLO 27: Preparación de cepa deficiente de iclR**

El factor de transcripción iclR se eliminó de CA07-0022 serA\*(G336V) para producir CA07-0022 serA\*(G336V)  $\Delta$ iclR. La cepa mutante de eliminación se preparó usando el método de inactivación de una etapa como en el ejemplo 5 y se eliminó el gen marcador resistente a antibiótico. Para la preparación de la cepa de eliminación de iclR, se realizó PCR con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 87 y 88.

**EJEMPLO 28: Ensayo de la cepa deficiente de iclR para la productividad de OPS**

La cepa preparada en el ejemplo 27 se evaluó para la productividad de OPS de la misma manera que en el ejemplo 9.

[Tabla 21]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	OPS (g/l)
CA07-0022 serA* (G336V)	22	38	2,5
CA07-0022 serA* (G336V) $\Delta$ iclR	22	40	2,7

Como es evidente a partir de los datos de la tabla 21, se descubrió que la productividad de OPS de la cepa de eliminación de iclR aumentaba.

**EJEMPLO 29: Construcción de vectores que portan acetil CoA sintasa (acs), monómero de piruvato oxidasa (poxB), acetato cinasa (ackA) y fosfato acetiltransferasa (pta) de E. coli**

Para potenciar la producción y reutilización de acetato en la cepa productora de O-fosfoserina, se construyeron plásmidos de expresión que portaban acs que codifica acetil CoA sintasa, poxB que codifica monómero de piruvato oxidasa, ackA que codifica acetato cinasa y pts que codifica fosfato acetiltransferasa, respectivamente.

Cada gen se obtuvo realizando PCR con pfu en el ADN genómico de *E. coli* W3110 con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 89 y 90 para acs, con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 91 y 92 para poxB y con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 93 y 94 para ackA y pta. Después del tratamiento con *HindIII*, cada uno de los productos de PCR así obtenido se clonó en el sitio EcoRV y HindIII en el vector pCL-Prmf-GFP construido por inserción de un promotor rnf de *E. coli* en pCL1920, para dar pCL-Prmf-acs, pCL-Prmf-poxB y pCL-Prmf-ackA-pta. Posteriormente, estos plásmidos se trataron con EcoRI para obtener insertos de ADN, es decir, Prmf-acs, Prmf-poxB y Prmf-ackA-pta, que después se introdujeron en pCC1BAC (EcoRI) (CopyControl™ pcc1BAC™ Vector, Epicentre. Cat. n.º CBAC311) para construir pCC1BAC-Prmf-acs, pCC1BAC-Prmf-poxB y pCC1BAC-Prmf-ackA-pta, respectivamente.

**EJEMPLO 30: Preparación de cepa productora de OPS de acs, poxB, ackA, pta potencia de E. coli y ensayo para la productividad de OPS**

La cepa CA07-0022 serA\*(G336V) se transformó con los tres vectores preparados en el ejemplo 29 y se ensayó para la productividad de OPS de la misma manera que en el ejemplo 9.

[Tabla 22]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	OPS (g/l)
CA07-0022 serA* (G336V)	21,9	35,5	2,45
CA07-0022 serA* (G336V) / pCC1BAC-Prmf-acs	23,6	40	2,65
CA07-0022 serA* (G336V) / pCC1BAC-Prmf-poxB	18,3	36,8	1,86
CA07-0022 serA* (G336V) / pCC1BAC-Prmf-ackA-pta	21,8	40	2,65

5 Como puede observarse en la tabla 22, la tasa de crecimiento de la cepa transformada con poxB disminuía mientras que la introducción de acs o ackA-pta aumentaba la tasa de crecimiento y la producción de OPS.

**EJEMPLO 31: Construcción de vectores que portan malato sintasa A (aceB), monómero de isocitrato liasa (aceA), fosfoenolpiruvato carboxinasa (pckA), malato sintasa G (glcB) y malato deshidrogenasa (maeB) de *E. coli***

10 Se construyeron plásmidos que permitían la expresión tanto de aceB que codifica malato sintasa A como aceA que codifica monómero de isocitrato liasa, pckA que codifica fosfoenolpiruvato carboxinasa, glcB que codifica malato sintasa G y maeB que codifica malato deshidrogenasa en *E. coli*, respectivamente.

15 Los genes se prepararon realizando PCR con pfu en el ADN genómico de *E. coli* W3110 con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 95 y 96 para aceBA, con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 97 y 98 para pckA, con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 99 y 100 para glcB y con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 101 y 102 para maeB. Después del tratamiento con *HindIII*, cada uno de los productos de PCR así obtenido se clonó en el sitio EcoRV y *HindIII* en el vector pCL-Prmf-GFP construido por inserción de un promotor rnf de *E. coli* en pCL1920, para dar pCL-Prmf-aceBA, pCL-Prmf-pckA, pCL-Prmf-glcB y pCL-Prmf-maeB.

**EJEMPLO 32: Preparación de cepa productora de OPS con aceB, aceA, pckA, glcB y maeB potenciada de *E. coli* y ensayo para la productividad de O-fosfoserina**

25 La cepa CA07-0022 serA\*(G336V) se transformó con los cuatro vectores preparados en el ejemplo 31 y se ensayó para la productividad de O-fosfoserina de la misma manera que en el ejemplo 9.

[Tabla 23]

Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	OPS (g/l)
CA07-0022 serA* (G336V)	23	40	2,4
CA07-0022 serA*(G336V) / pCL-Prmf-aceBA	20	36	1,9
CA07-0022 serA*(G336V) / pCL-Prmf-pckA	10	11	0
CA07-0022 serA*(G336V) / pCL-Prmf-glcB	21	40	2,8
CA07-0022 serA*(G336V) / pCL-Prmf-maeB	21	40	2,9

30 Como puede observarse en la tabla 23, la tasa de consumo de azúcar y la productividad de OPS de la cepa disminuyó algo cuando se transformaba con aceBA y la tasa de crecimiento disminuía significativamente cuando se transformaba con pckA, mientras que la introducción de glcB o maeB aumentaba la productividad de OPS.

**EJEMPLO 33: Construcción de vectores que portan glioxilato carboligasa (gcl), tartronato semialdehído reductasa 2 (glxR) y glicerato cinasa II (glxK)**

35 Se clonó gcl que codifica glioxilato carboligasa, glxR que codifica tartronato semialdehído reductasa 2 y glxK que codifica glicerato cinasa II, todos los cuales están implicados en la conversión de glioxilato en 3-fosfoglicerato, de la siguiente manera. Los genes se obtuvieron realizando PCR con en el ADN genómico de *E. coli* W3110 con un par de cebadores de las SEQ ID NO: 103 y 104 para gcl y con pares de cebadores de las SEQ ID NO: 105 a 108 para glxR-glxK. Después de la digestión con EcoRV y *HindIII*, cada uno de los productos de PCR se clonó en los sitios EcoRV y *HindIII* en el vector pCL-Prmf-GFP construido por inserción de un promotor rnf de *E. coli* en pCL1920 para producir plásmidos recombinados, llamados pCL-Prmf-gcl, pCL-Prmf-glxR-glxK y pCL-Prmf-glxR-glxK-Prmf-gcl, respectivamente.

**EJEMPLO 34: Introducción de vectores que portan gcl, glxR, glxK en cepa productora de O-fosfoserina y ensayo para la productividad de O-fosfoserina**

50 Los tres plásmidos construidos en el ejemplo 33 se introdujeron en CA07-0022 serA\*(G336V), que después se evaluaron para la productividad de O-fosfoserina de la misma manera que en el ejemplo 9. Los resultados se

resumen en la tabla 24, a continuación.

[Tabla 24]

Tiempo	Cepa	DO 562 nm	Azúcar consumido (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
24h	CA07-0022 serA*(G336V)	15,6	24	1,25
	CA07-0022 serA*(G336V) / pCL-Prmf-gcl	19,6	29,7	1,2
	CA07-0022 serA*(G336V) / pCL-Prmf-glxR-glxK	21	33	1,3
	CA07-0022 serA*(G336V) / pCL-Prmf-glxR-glxK-Prmf-gcl	18,4	29,7	1,03
48h	CA07-0022 serA* (G336V)	23	40	2,4
	CA07-0022 serA* (G336V) / pCL-Prmf-gcl	31,5	40	1,67
	CA07-0022 serA* (G336V) / pCL-Prmf-glxR-glxK	26,2	40	1,5
	CA07-0022 serA* (G336V) / pCL-Prmf-glxR-glxK-Prmf-gcl	22	40	1,61

5 Como puede observarse en la tabla 24, la productividad de O-fosfoserina final de las cepas transformadas respectivamente con gcl, glxR-glxK y glxR-glxK-gcl estaba disminuida, pero la tasa de crecimiento y la tasa de consumo de azúcar estaban aumentadas, en comparación con la propia cepa CA07-0022 serA\*(G336V). Particularmente, se descubrió que la introducción de glxR-glxK tenía el máximo aumento en la tasa de crecimiento y la tasa de consumo de azúcar.

10

**EJEMPLO 35: Evaluación de cepa productora de O-fosfoserina en un fermentador**

15 Se incubaron cepas CA07-0022 serA\*(G336V)/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC a 33 °C durante 24 horas en placas de agar MMYE (2 g/l de glucosa, sulfato de magnesio 2 mM, cloruro de calcio 0,1 mM, 6 g/l de pirofosfato de sodio, 0,5 g/l de cloruro de sodio, 3 g/l de dihidrogenofosfato de potasio, 10 g/l de extracto de levadura, 18 g/l de agar) que contenían 50 µg/ml de espectinomicina. Las colonias resultantes se rasparon de 1/10 del área de cada placa de agar, se inocularon en un medio de siembra que contenía 50 µg/ml de espectinomicina, 10 g/l de glucosa, 0,5 g/l de sulfato de magnesio, 3 g/l de dihidrogenofosfato de potasio, 10 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de cloruro de sodio, 1,5 g/l de cloruro de amonio, 12,8 g/l de pirofosfato de sodio, 1 g/l de glicina) en un matraz con deflector, y se  
20 incubaron a 30 °C durante seis horas mientras se agitaba a 200 r.p.m. A 300 ml de un medio principal en un fermentador de 1 l, se añadió el cultivo de siembra resultante en una cantidad tan grande como de un 16 % del volumen del medio principal, seguido de incubación a 33 °C y pH 7,0. El medio principal tenía la composición dada en la tabla 25, a continuación.

25

[Tabla 25]

[Composición del medio principal]	
Glucosa	20 g/l
Sulfato de magnesio	0,3 g/l
Dihidrogenofosfato de potasio	1,5 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Sulfato de amonio	5 g/l
Triptona	10 g/l
Glicina	2 g/l
Cloruro de sodio	0,5 g/l
Citrato de sodio	1 g/l
Sulfuro de hierro	75 mg/l
Cloruro de calcio	15 mg/l
Oligoelementos	1 ml/l
[Oligoelementos]	
Cloruro de cobalto	0,7 g/l
Sulfato de zinc	0,3 g/l
Molibdato	0,15 g/l
Ácido bórico	1,2 g/l
Sulfato de manganeso	1,6 g/l
Sulfato de cobre	0,25 g/l

Durante la incubación, el pH del medio de cultivo se ajustó a 7,0 con agua amoniacal. Tras la reducción de glucosa

del medio de cultivo, se realizó fermentación de tipo semicontinua añadiendo una solución de glucosa de 520 g/l. Después de la fermentación durante 80 horas, se produjo O-fosfofoserina a una concentración de 19,5 g/l medida por HPLC.

## 5 <Desarrollo y caracterización de O-fosfofoserina (OPS) sulfhidrilasa (OPSS)>

### EJEMPLO 36: Desarrollo de OPS sulfhidrilasa (OPSS)

10 Se informa que *Aeropyrum pernix*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Trichomonas vaginalis* tienen O-fosfofoserina sulfhidrilasa (OPSS), una enzima que emplea O-fosfo-L-serina (OPS), en lugar de O-acetil serina (OAS) en *E. coli*, como sustrato para la síntesis de cisteína (Mino K y Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Burns KE, Baumgart S, Dorrestein PC, Zhai H, McLafferty FW y Begley TP, J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC y Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006). Basándose en el informe, los autores de la presente invención descubrieron dos tipos de OPS sulfhidrilasa, que convierte OPS en cisteína, de *Aeropyrum pernix* y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. De ellas, la enzima OPS derivada de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se usó para el cribado de homología de aminoácidos. Como resultado, se fijaron tres tipos de OPSS de *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155, *Rhodococcus jostii* RHA1 y *Nocardia farcinica* IFM 10152.

20 Para obtener OPSS de cada cepa, se construyó un sistema de vector pET28a (Novagen), que se usa típicamente para la expresión de enzimas. Cada uno de los moldes y cebadores para su uso en la clonación de los cinco diferentes genes de OPS sulfhidrilasa y los plásmidos recombinantes resultantes se resumen en la tabla 26, a continuación. Se usaron combinaciones adecuadas de los moldes y los cebadores, que se dan en la tabla 26, para PCR para la amplificación de los genes de OPSS respectivos. Los productos de PCR y el vector pET28a se digirieron con NdeI y HindIII (37 °C durante 3 horas). Cada uno de los fragmentos génicos se ligó al vector pET28a digerido (Novagen). La secuenciación de bases confirmó la construcción de los vectores de expresión que portan cada uno de los genes OPSS. Los vectores de expresión de enzima se introdujeron en *E. coli* (DE3) para producir cepas que pueden expresar cinco enzimas OPSS. Los nombres de las enzimas se dan en la tabla 26, a continuación.

30

[Tabla 26]

Enzima	Vector	Molde	Cebador
Ape-OPSS	pET28a-Ape-OPSS	ADN sintético	SEQ ID NO: 109 y 110
Mtb-OPSS	pET28a-Mtb-OPSS	ADN genómico de <i>Mtb</i>	SEQ ID NO: 111 y 112
Msm-OPSS	pET28a-Msm-OPSS	ADN genómico de <i>Msm</i>	SEQ ID NO: 113 y 114
Rjo-OPSS	pET28a-Rjo-OPSS	ADN genómico de <i>Rjo</i>	ID NO: 115 y 116
Nfa-OPSS	pET28a-Nfa-OPSS	ADN genómico de <i>Nfa</i>	SEQ ID NO: 117 y 118

La expresión de las enzimas se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante del sistema pET (Novagen). Se inocularon colonias individuales de cada cepa de las placas LB en 5 ml de caldo LB y se incubaron a 37 °C durante 16 horas mientras se agitaban a 200 rpm. Los cultivos se transfirieron a 25 ml de caldo LB reciente (en matraces de 250 ml) y se incubaron a una DO<sub>600</sub> de 0,5 - 0,6 (durante 2 - 3 horas) en las mismas condiciones, inmediatamente después de lo cual se añadió IPTG 1 mM al medio para inducir la expresión de las enzimas durante la incubación a 18 °C durante 18 horas mientras se agitaban a 120 rpm. Las enzimas se purificaron usando columnas de Ni-NTA para marca de His, con la ayuda de His SpinTrap (GE Healthcare). De las cinco enzimas OPSS así aisladas, se descubrió que cuatro eran formas insolubles, siendo una (Rjo-OPSS) un cuerpo de inclusión, analizado por electroforesis en SDS-PAGE al 14 %.

### EJEMPLO 37: Ensayo de OPS sulfhidrilasa (OPSS) para la actividad de síntesis de cisteína

45 Las enzimas OPS sulfhidrilasa obtenidas de las cuatro cepas de microorganismos se ensayaron para la capacidad de catalizar la conversión de O-fosfofoserina (OPS) en cisteína. Con respecto a las condiciones de ensayo y los métodos (ensayo de enzima cysM), se hizo referencia a los informes previos (Mino K y Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Burns KE, Baumgart S, Dorrestein PC, Zhai H, McLafferty FW y Begley TP, J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC y Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006). La cantidad del sustrato usado se representa por una unidad de ml. Las condiciones de ensayo para la actividad enzimática se resumen en la tabla 27, a continuación.

50

[Tabla 27]

Solución madre	Concentración final	Blanco	OPS sulfhidrilasa
6x his-enzima		-	40 (50 mg)
HEPES 1 M (pH 7,4)	HEPES 100 mM	100	100
Na <sub>2</sub> S 0,5 M	Na <sub>2</sub> S 10 mM	20	20
PLP 10 mM	PLP 0,2 mM	20	20
OPS 100 mM	OPS 5 mM	0	50
DW		790	750
Total		1000	1000

Las soluciones de reacción exceptuando las enzimas se incubaron a 37 °C durante 5 min, después de lo cual se añadieron 50 mg de OPS sulfhidrilasa purificada a la solución de reacción. En momentos predeterminados durante la incubación a 37 °C, se recogieron 100 ml de las reacciones enzimáticas y se mezclaron con 100 ml de TCA al 33,2 % para detener la reacción enzimática. Las concentraciones de cisteína de las reacciones enzimáticas se analizaron cuantitativamente midiendo la absorbancia a DO<sub>560</sub> de acuerdo con el método de Gaitonde. Las actividades de síntesis de cisteína de las cuatro enzimas OPS sulfhidrilasa diferentes se resumen en la tabla 28, a continuación. Los títulos de síntesis de cisteína de las enzimas OPSS se expresan como tasas de conversión de cisteína con el tiempo de reacción.

[Tabla 28]

	Tasa de conversión de cisteína (%)		
	10 min	30 min	60 min
Ape-OPSS	63,4	89,7	97,4
Mtb-OPSS	1,7	4,8	10,1
Msm-OPSS	12,8	25	43,7
Nfa-OPSS	0,1	0,1	0,2

Las enzimas OPS sulfhidrilasa derivadas de *Aeropyrum pernix* y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, que se presentaron previamente (Mino K y Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC y Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006), se confirmó que tenían la actividad de uso de OPS como sustrato para sintetizar cisteína. La actividad de síntesis de cisteína de la OPS sulfhidrilasa novedosa derivada de *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155, que se obtuvo por cribado de homología de aminoácidos con la enzima Mtb-OPSS, se descubre por primera vez. Como se observa en los datos de la tabla 28, la tasa de conversión de OPS en cisteína de Ape-OPSS alcanzó casi un 100 % en una hora. La tasa de conversión final de la enzima Msm-OPSS, que se seleccionó recientemente a través de cribado enzimático basándose en la OPSS derivada de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv presentada previamente, fue de un 43,7 %, que fue 4,3 veces tan alta como la de Mtb-OPSS. Por otro lado, la OPS sulfhidrilasa novedosa derivada de *Nocardia farcinica* IFM 10152, obtenida por el cribado de homología, mostró actividad insuficiente de conversión de O-fosfoserina en cisteína.

#### **EJEMPLO 38: Preparación de Mtb-T y Msm-T que codifican Mtb-OPSS y Msm-OPSS truncados en los 5 restos de aminoácido del extremo C**

OPSS derivada de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb-OPSS), que cataliza la conversión de OPS en cisteína con la ayuda de las enzimas adicionales mec+ y cysO, se informa de que puede usar una fuente de azufre que contiene S<sup>2-</sup> en la conversión de OPS en cisteína incluso en ausencia de las enzimas adicionales cuando se retiran cinco restos de aminoácido del extremo C de la misma (Agren D, Schnell R y Schneider G, FEBS Letters, 583: 330-336, 2009). Basándose en este informe, se obtuvo Mtb-T (SEQ ID NO: 11), que puede convertir rápidamente OPS en presencia de S<sup>2-</sup> como fuente de azufre. También se obtuvo Msm-T de Msm-OPSS (SEQ ID NO: 9) que comparte una homología de aminoácidos con Mtb-OPSS. Se construyeron vectores de expresión que portan los dos mutantes enzimáticos. A este respecto, se realizó PCR con pfu en el ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv o *Mycobacterium smegmatis* en presencia de un par de cebadores de las SEQ ID NO: 119, 120, 121 y 122. Los fragmentos génicos de OPSS así obtenidos se trataron con NdeI y HindIII y se clonaron en el vector pET28a digerido con las mismas enzimas de restricción para construir los vectores de expresión recombinantes llamados pET28a-Mtb-T y pET28a-Msm-T, respectivamente. Los vectores de expresión recombinantes se introdujeron en *E. coli* (DE3). La expresión de las dos enzimas OPSS mutantes se confirmó por SDS PAGE al 14 %. Las dos enzimas

OPSS mutantes se purificaron y expresaron en las mismas condiciones que en el ejemplo 36. Como resultado, se obtuvieron Mtb-T (SEQ ID NO: 11) y Msm-T (SEQ ID NO: 10).

#### EJEMPLO 39: Ensayo de Mtb-T y Msm-T para la actividad de conversión de cisteína

5 Basándose en el informe de que mutantes de OPSS derivados de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv desprovistos de cinco restos de aminoácidos del extremo C muestran afinidad aumentada por una fuente de azufre que contiene el grupo S<sup>2-</sup> incluso en ausencia de enzimas subsidiarias (Agren D, Schnell R y Schneider G, FEBS Letters, 583: 330-336, 2009), se obtuvieron Mtb-T y Msm-T. Se evaluaron para la actividad enzimática midiendo las tasas finales  
10 de conversión de cisteína. La actividad enzimática se ensayó en las mismas condiciones y de la misma manera que en el ejemplo 37. La cisteína producida se analizó cuantitativamente usando el método de Gaitonde.

[Tabla 29]

	Tasa de conversión de cisteína (%)		
	10 min	30 min	60 min
Mtb-T	9,5	18,6	37,1
Msm-T	20,3	54,6	100

15 Como se observa en la tabla 29, Msm-T, que está desprovista de los cinco restos de aminoácidos del extremo C de OPSS derivada de *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155 permitió la conversión de cisteína a partir del sustrato a una tasa de un 100 % en una hora.

20 Cuando se modificó su secuencia de aminoácidos, la O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) puede catalizar de forma más eficaz la biosíntesis de L-cisteína.

#### EJEMPLO 40: Requisito de cofactor para la actividad de OPS sulfhidrilasa

25 Para examinar el efecto de cofactores sobre la conversión de cisteína de OPSS, se midió la tasa de conversión de cisteína de Msm-T en ausencia o presencia de PLP (piridoxal-5'-fosfato) y DTT (ditiotreitól). A este respecto, los sustratos de caldo de OPS 50 mM y Na<sub>2</sub>S 100 mM se hicieron reaccionar a 37 °C durante 30 min en presencia de DTT 25 mM o PLP 0,2 mM. La cisteína así producida se analizó cuantitativamente usando el método de Gaitonde. Como se observa en la tabla 30, la tasa de conversión de cisteína en presencia tanto de PLP como de DTT fue 2,3  
30 veces tan grande como en ausencia tanto de PLP como de DTT. Por tanto, se observó que tanto PLP como DTT tienen una influencia positiva sobre la conversión.

[Tabla 30]

Msm-T	Tasa de conversión de cisteína (%)
(-) PLP, (-) DTT	23,62
(+) PLP, (-) DTT	33,21
(-) PLP, (+) DTT	40,08
(+) PLP, (+) DTT	54,65

#### EJEMPLO 41: La influencia de la temperatura sobre la actividad de la OPS sulfhidrilasa

35 Se examinaron las tasas de conversión de cisteína de Ape-OPSS y Msm-T de acuerdo con las temperaturas. La actividad enzimática a 37 °C y 60 °C se midió 2, 5, 10, 30 y 60 min después de la reacción. La reacción se realizó en condiciones de HEPES 100 mM (pH 7,4), OPS 5 mM, Na<sub>2</sub>S 10 mM, PLP 0,2 mM y 50 µg/ml de CysM. La cantidad de cisteína producida se determinó usando el método de Gaitonde. En las condiciones de un tampón, como se muestra en la FIG. 2, Ape-OPSS mostró una tasa de reacción inicial más rápida a 37 °C, así como mayor reactividad  
40 a 60 °C de lo que lo hizo Msm-T.

#### EJEMPLO 42: Estabilidad térmica de OPS sulfhidrilasa

45 Se analizaron Ape-OPSS y Msm-T para la estabilidad térmica. Cada una de las enzimas se diluyó hasta una concentración de 2 mg/ml en un caldo de OPS y se trató térmicamente a 37 °C y 60 °C durante 10, 30, 60, 120 y 240 min, seguido de reacción a 37 °C durante 30 min en las condiciones de OPS 5 mM, Na<sub>2</sub>S 10 mM, PLP 0,2 mM y HEPES 100 mM (pH 7,4). Para esta reacción, se emplearon 10 µg/ml de Ape-OPSS y 50 µg/ml de Msm-T. Las cantidades de la cisteína producida se midieron usando el método de Gaitonde. Se observó que Ape-OPSS retenía su actividad intacta a pesar del tratamiento térmico a 60 °C durante 4 horas mientras que la actividad de Msm-T se  
50



mantenía a 37 °C, pero disminuía en un 50 % tras el tratamiento térmico a 60 °C durante 30 min. Los resultados se dan en la tabla 31, a continuación.

[Tabla 31]

	Actividad relativa (%)					
Tiempo de calentamiento (min)	(-)	10 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Ape-OPSS	100	102	107	100	107	101
Msm-T	100	82	50	32	19	8

5 Se hizo un examen de la retención de actividad enzimática a 37 °C cuando se usaba Msm-T en una cantidad de 50 µg/ml, que es una concentración práctica en caldo de OPS. En ausencia de Na<sub>2</sub>S, se trataron 50 µg/ml de Msm-T, junto con caldo de OPS 50 mM y PLP 0,2 mM, a 37 °C durante 0,5, 1, 2, 4 y 6 horas, después de lo cual se añadió Na<sub>2</sub>S para inducir la reacción enzimática. Después de la reacción durante 30 min, se midió la actividad de Msm-T. Las cantidades de la cisteína producida se determinaron usando el método de Gaitonde. Como resultado, se disminuyó la actividad de Msm-T por debajo de un 50 % 2 horas después de la reacción a 37 °C en caldo de OPS (tabla 32).

[Tabla 32]

Tiempo	0	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
Tasa de conversión de cisteína (%)	100	88	73	47	11	3

15 **EJEMPLO 43: La influencia del pH sobre la OPS sulfhidrilasa**

20 Se examinaron las tasas de conversión de cisteína de Ape-OPSS y Msm-T de acuerdo con los pH. En tampón 100 mM, Ape-OPSS y Msm-T, que tienen, cada una, una concentración de 50 µg/ml, se sometieron a reacción a 37 °C durante 10 min. A este respecto, se usó tampón fosfato de K con un pH de 6,4 / 7,0 / 7,4 / 8,0, tampón Tris-HCl con un pH de 7,0 / 7,4 / 8,0 / 8,5 / 8,8 y tampón carbonato de Na con un pH de 8,0 / 8,5 / 9,0 / 10,0. El análisis cuantitativo de la cisteína producida se realizó usando el método de Gaitonde. Como se observa en la FIG. 3, Msm-T mostró la máxima actividad a un pH de 8,0 a 9,0 independientemente del tampón. En cuanto a Ape-OPSS, su máxima actividad se detectó en fosfato de K (pH 7,4), con un pH óptimo que difiere de un tampón a otro.

25 **EJEMPLO 44: Efecto de iones sobre la actividad de OPS sulfhidrilasa**

30 Se examinaron los efectos de iones sobre la actividad de las enzimas OPSS de la siguiente manera. En una mezcla de reacción que contenía OPS 5 mM, Na<sub>2</sub>S 10 mM, PLP 0,2 mM y HEPES 100 mM (pH 7,4), las enzimas se sometieron a reacción a 37 °C durante 30 min en presencia de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1, 3, 5, 10, 20 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5, 1, 2, 4, 8 g/l) o NH<sub>4</sub>Cl (0,2, 0,5, 1, 2 g/l). Se usaron Ape-OPSS y Msm-T a una concentración de 10 µg/ml y 50 µg/ml, respectivamente. Las cantidades de la cisteína producida se determinaron usando el método de Gaitonde.

35 No se detectaron cambios en la tasa de conversión de cisteína cuando se añadía (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a la mezcla de reacción. Por otro lado, como se observa en la tabla 33, la tasa de conversión de cisteína se disminuyó con un aumento en la concentración de NH<sub>4</sub>Cl. Particularmente, la actividad enzimática máxima se disminuyó en más de un 70 % cuando se añadían 2 g/l de NH<sub>4</sub>Cl. Por lo tanto, se observó que NH<sub>4</sub>Cl tenía un efecto negativo sobre la actividad de conversión de OPS sulfhidrilasa.

[Tabla 33]

Relativo	Actividad relativa (%)	
NH <sub>4</sub> Cl	Ape-OPSS	Msm-T
0	100,00	100,00
0,2	86,26	91,49
0,5	73,35	91,30
1	49,11	67,11
2	27,72	47,12

**EJEMPLO 45: Efecto de fuente de azufre sobre la actividad de síntesis de cisteína de OPS sulfhidrilasa**

Se realizó un experimento para examinar el efecto de las fuentes de azufre sobre la actividad de síntesis de cisteína de cada enzima. En una mezcla de reacción que contenía OPS 5 mM, PLP 0,2 mM y HEPES 100 mM, cada enzima (50 µg/ml de Ape-OPSS, 50 µg/ml de Msm-T) se sometió a reacción a 37 °C durante 1 hora en presencia de Na<sub>2</sub>S, NaSH o Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 10 mM. Las cantidades de la cisteína producida se midieron usando el método de Gaitonde. Se observó que Ape-OPSS prefería Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como fuente de azufre, mientras que Msm-T prefiere Na<sub>2</sub>S. Los resultados se resumen en la tabla 34, a continuación.

[Tabla 34]

Enzima	Actividad relativa (%)		
	Na <sub>2</sub> S	NaSH	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Ape-OPSS	100,0	95,2	142,3
Msm-T	106,7	98,3	66,2

**EJEMPLO 46: Construcción del vector de expresión que porta OPS sulfhidrilasa (sistema pCL-Pcj1) y expresión en *E. coli***

Se realizó PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 123 y 124, con el vector pET28a-Msm-T que sirve como molde. El producto de PCR así obtenido se trató con *EcoRV* y *HindIII* y se clonó en pCL-P(CJ1) para construir un vector recombinante llamado pCL-P(CJ1)-Msm-T. Para examinar una diferencia en el nivel de expresión de Msm-T entre el sistema pET y el sistema pCL-Pcj1, se prepararon cepas para expresar la enzima. El sistema pET se introdujo en Rosetta (DE3) mientras que el sistema pCL-Pcj1 usó la cepa K12G. Se inocularon colonias individuales recogidas de placas LB en 5 ml de caldo LB y se cultivaron a 37 °C durante 16 horas mientras se agitaba a 200 rpm. Estos cultivos se transfirieron a 25 ml de caldo LB fresco que contenía canamicina o espectinomicina y glucosa al 0,2 % (en matraces de 250 ml) y se incubaron a una DO<sub>600</sub> de 0,5 - 0,6, inmediatamente después de lo cual se añadió IPTG 1 mM al medio para inducir las enzimas a expresar. Durante la incubación a 37 °C mientras se agitaba a 200 rpm, se midieron los niveles de expresión de la enzima a diversos tiempos de cultivo (8, 16, 24 horas). Los niveles de expresión enzimática de los dos sistemas se analizaron en SDS PAGE al 14 % SDS PAGE (FIG. 4).

**EJEMPLO 47: Síntesis de cisteína por OPS sulfhidrilasa con el caldo de fermentación de OPS purificada**

Se determinaron las tasas de conversión de OPS purificada en cisteína de Msm-T y Ape-OPSS. En presencia de 75 µg/ml de cada una de las enzimas y PLP 0,2 mM, OPS 60 mM purificada del caldo de fermentación de OPS se hizo reaccionar con Na<sub>2</sub>S 120 mM a 37 °C o 70 °C durante 30, 60, 90 y 120 min. La reacción se realizó únicamente a 37 °C para Msm-T, pero tanto a 37 °C como a 70 °C para Ape-OPSS. Las cantidades de la cisteína producida se midieron usando el método de Gaitonde. Como se observa en la FIG. 5, un caldo de fermentación de OPS purificada sirvió bien como sustrato para la conversión enzimática en cisteína. Particularmente, la tasa de conversión de Ape-OPSS se aumentó a 70 °C incluso tras el uso del caldo de fermentación de OPS purificada.

**EJEMPLO 48: Síntesis de cisteína por OPS sulfhidrilasa con el caldo de fermentación de OPS**

Cuando se usaba un caldo de fermentación de OPS como sustrato, las tasas de conversión de cisteína de Msm-T y Ape-OPSS se midieron de acuerdo con las concentraciones de las enzimas. En presencia de Na<sub>2</sub>S 100 mM y PLP 0,2 mM, se hicieron reaccionar 50 mM de caldo de fermentación de OPS con 5 µg/ml o 50 µg/ml de cada una de Msm-T y Ape-OPSS a 37 °C. Se midieron las cantidades de la cisteína producida usando el método de Gaitonde. Como se observa en la FIG. 6, la máxima tasa de conversión se detectó en 50 µg/ml de Msm-T. Además, tras el uso del caldo de fermentación de OPS como sustrato, la actividad de Msm-T fue mayor que la de Ape-OPSS.

**EJEMPLO 49: Tasa de conversión de cisteína de acuerdo con la concentración de OPS**

Para examinar el efecto de la concentración de OPS sobre la tasa de conversión de Msm-T, se añadieron cantidades predeterminadas de OPS purificada al caldo de fermentación de OPS para inducir la reacción de conversión. La enzima se usó en una cantidad de 50 µg. Las cantidades de cisteína en la solución de reacción se midieron usando el método de Gaitonde. Msm-T mostró una tasa de conversión tan alta como de un 100 % cuando la concentración de OPS era de aproximadamente 30 g/l.

Cuando la concentración de OPS excedía de 50 g/l, se descubrió que tanto la tasa de conversión como el porcentaje de conversión disminuían. A partir de estos resultados, se entiende que cuando se usa caldo de fermentación de OPS como sustrato, hay una relación de concentración óptima entre OPS y la enzima.

[Tabla 35]

Tasa de conversión de cisteína (Msm-T 50 ug)						
Tiempo	0 min	10 min	30 min	60 min	120 min	180 min
OPS mediad 10,65 g/l	0	23,03	65,38	65,70	61,95	55,35
OPS media 36,09 g/l	0	1,15	10,23	28,07	97,84	100,34
OPS media 55,6g/l	0	0	2,36	7,41	42,69	66,67

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5
- <110> CJ CheilJedang Corporation
- 10 <120> MICROORGANISMO QUE PRODUCE O-FOSFOSERINA Y MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE L-CISTEÍNA O DERIVADOS DE LA MISMA A PARTIR DE O-FOSFOSERINA USANDO EL MISMO
- <130> T3048 EP S3
- 15 <150> KR10-2010-0102664  
<151> 20/10/2010
- <150> KR10-2011-0086081  
<151> 26/08/2011
- 20 <160> 124
- <170> KopatentIn 1.71
- 25 <210> 1  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> Corynebacterium glutamicum 13032
- 30 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(446)  
<223> fosfoferina fosfatasa, SerB
- 35 <400> 1

ES 2 711 830 T3

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

ES 2 711 830 T3

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

Thr Val Pro Asp Val Ser Pro Gly Gly Gly Glu Ala Met Arg Lys Ala  
 180 185 190

Leu Ala Ala Leu Thr Ser Glu Leu Asn Val Asp Ile Ala Ile Glu Arg  
 195 200 205

Ser Gly Leu Leu Arg Arg Ser Lys Arg Leu Val Cys Phe Asp Cys Asp  
 210 215 220

Ser Thr Leu Ile Thr Gly Glu Val Ile Glu Met Leu Ala Ala His Ala  
 225 230 235 240

Gly Lys Glu Ala Glu Val Ala Ala Val Thr Glu Arg Ala Met Arg Gly  
 245 250 255

Glu Leu Asp Phe Glu Glu Ser Leu Arg Glu Arg Val Lys Ala Leu Ala  
 260 265 270

Gly Leu Asp Ala Ser Val Ile Asp Glu Val Ala Ala Ala Ile Glu Leu  
 275 280 285

Thr Pro Gly Ala Arg Thr Thr Ile Arg Thr Leu Asn Arg Met Gly Tyr  
 290 295 300

Gln Thr Ala Val Val Ser Gly Gly Phe Ile Gln Val Leu Glu Gly Leu  
 305 310 315 320

Ala Glu Glu Leu Glu Leu Asp Tyr Val Arg Ala Asn Thr Leu Glu Ile  
 325 330 335

Val Asp Gly Lys Leu Thr Gly Asn Val Thr Gly Lys Ile Val Asp Arg  
 340 345 350

Ala Ala Lys Ala Glu Phe Leu Arg Glu Phe Ala Ala Asp Ser Gly Leu  
 355 360 365

Lys Met Tyr Gln Thr Val Ala Val Gly Asp Gly Ala Asn Asp Ile Asp  
 370 375 380

Met Leu Ser Ala Ala Gly Leu Gly Val Ala Phe Asn Ala Lys Pro Ala  
 385 390 395 400

Leu Lys Glu Ile Ala Asp Thr Ser Val Asn His Pro Phe Leu Asp Glu  
 405 410 415

Val Leu His Ile Met Gly Ile Ser Arg Asp Glu Ile Asp Leu Ala Asp  
 420 425 430

Gln Glu Asp Gly Thr Phe His Arg Val Pro Leu Thr Asn Ala  
 435 440 445

<210> 2

# ES 2 711 830 T3

<211> 322  
<212> PRT  
<213> Escherichia coli K12 W3110

5 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(322)  
<223> fosfoserina fosfatasa, SerB

10 <400> 2

ES 2 711 830 T3

Met Pro Asn Ile Thr Trp Cys Asp Leu Pro Glu Asp Val Ser Leu Trp  
1 5 10 15

Pro Gly Leu Pro Leu Ser Leu Ser Gly Asp Glu Val Met Pro Leu Asp  
20 25 30

Tyr His Ala Gly Arg Ser Gly Trp Leu Leu Tyr Gly Arg Gly Leu Asp  
35 40 45

Lys Gln Arg Leu Thr Gln Tyr Gln Ser Lys Leu Gly Ala Ala Met Val  
50 55 60

Ile Val Ala Ala Trp Cys Val Glu Asp Tyr Gln Val Ile Arg Leu Ala  
65 70 75 80

Gly Ser Leu Thr Ala Arg Ala Thr Arg Leu Ala His Glu Ala Gln Leu  
85 90 95

Asp Val Ala Pro Leu Gly Lys Ile Pro His Leu Arg Thr Pro Gly Leu  
100 105 110

Leu Val Met Asp Met Asp Ser Thr Ala Ile Gln Ile Glu Cys Ile Asp  
115 120 125

Glu Ile Ala Lys Leu Ala Gly Thr Gly Glu Met Val Ala Glu Val Thr  
130 135 140

Glu Arg Ala Met Arg Gly Glu Leu Asp Phe Thr Ala Ser Leu Arg Ser  
145 150 155 160

Arg Val Ala Thr Leu Lys Gly Ala Asp Ala Asn Ile Leu Gln Gln Val  
165 170 175

Arg Glu Asn Leu Pro Leu Met Pro Gly Leu Thr Gln Leu Val Leu Lys  
180 185 190

Leu Glu Thr Leu Gly Trp Lys Val Ala Ile Ala Ser Gly Gly Phe Thr  
195 200 205

Phe Phe Ala Glu Tyr Leu Arg Asp Lys Leu Arg Leu Thr Ala Val Val  
210 215 220

Ala Asn Glu Leu Glu Ile Met Asp Gly Lys Phe Thr Gly Asn Val Ile  
225 230 235 240

Gly Asp Ile Val Asp Ala Gln Tyr Lys Ala Lys Thr Leu Thr Arg Leu  
245 250 255

Ala Gln Glu Tyr Glu Ile Pro Leu Ala Gln Thr Val Ala Ile Gly Asp  
260 265 270

ES 2 711 830 T3

Gly Ala Asn Asp Leu Pro Met Ile Lys Ala Ala Gly Leu Gly Ile Ala  
275 280 285

Tyr His Ala Lys Pro Lys Val Asn Glu Lys Ala Glu Val Thr Ile Arg  
290 295 300

His Ala Asp Leu Met Gly Val Phe Cys Ile Leu Ser Gly Ser Leu Asn  
305 310 315 320

Gln Lys

<210> 3

<211> 530

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa(E235K), SerA(E235K)

<400> 3



ES 2 711 830 T3

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

ES 2 711 830 T3

195					200					205					
Thr	Lys	Glu	Thr	Ala	Gly	Met	Phe	Asp	Ala	Gln	Leu	Leu	Ala	Lys	Ser
	210					215					220				
Lys	Lys	Gly	Gln	Ile	Ile	Ile	Asn	Ala	Ala	Arg	Gly	Gly	Leu	Val	Asp
225				230						235					240
Glu	Gln	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Ile	Glu	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Gly	Ala
				245					250					255	
Gly	Phe	Asp	Val	Tyr	Ser	Thr	Glu	Pro	Cys	Thr	Asp	Ser	Pro	Leu	Phe
			260					265					270		
Lys	Leu	Pro	Gln	Val	Val	Val	Thr	Pro	His	Leu	Gly	Ala	Ser	Thr	Glu
		275					280					285			
Glu	Ala	Gln	Asp	Arg	Ala	Gly	Thr	Asp	Val	Ala	Asp	Ser	Val	Leu	Lys
	290					295					300				
Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	Phe	Val	Ala	Asp	Ala	Val	Asn	Val	Ser	Gly	Gly
305					310					315					320
Arg	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ala	Val	Trp	Met	Asp	Leu	Ala	Arg	Lys	Leu
				325					330					335	
Gly	Leu	Leu	Ala	Gly	Lys	Leu	Val	Asp	Ala	Ala	Pro	Val	Ser	Ile	Glu
			340					345					350		
Val	Glu	Ala	Arg	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Glu	Gln	Val	Asp	Ala	Leu	Gly
		355						360				365			
Leu	Ser	Ala	Val	Arg	Gly	Leu	Phe	Ser	Gly	Ile	Ile	Glu	Glu	Ser	Val
	370					375					380				
Thr	Phe	Val	Asn	Ala	Pro	Arg	Ile	Ala	Glu	Glu	Arg	Gly	Leu	Asp	Ile
385					390					395					400
Ser	Val	Lys	Thr	Asn	Ser	Glu	Ser	Val	Thr	His	Arg	Ser	Val	Leu	Gln
				405					410					415	
Val	Lys	Val	Ile	Thr	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Val	Gly	Ala
			420					425					430		
Leu	Thr	Gly	Leu	Glu	Arg	Val	Glu	Lys	Ile	Thr	Arg	Ile	Asn	Gly	Arg
		435					440					445			
Gly	Leu	Asp	Leu	Arg	Ala	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Phe	Leu	Gln	Tyr	Thr
	450					455					460				
Asp	Ala	Pro	Gly	Ala	Leu	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Lys	Leu	Gly	Ala	Ala
465					470					475					480
Gly	Ile	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Gln	Ala	Glu	Lys	Gly	Asp
				485					490					495	
Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Arg	Val	Glu	Ser	Ala	Val	Ser	Glu	Glu	Leu
			500					505					510		
Glu	Ala	Glu	Ile	Asn	Ala	Glu	Leu	Gly	Ala	Thr	Ser	Phe	Gln	Val	Asp

515

520

525

**Leu Asp**  
**530**

5 <210> 4  
<211> 333  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa(197 delta), SerA(197 delta)

<400> 4

ES 2 711 830 T3

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

ES 2 711 830 T3

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala  
245 250 255

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe  
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu  
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys  
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly  
305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala  
325 330

<210> 5  
<211> 410  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa(G336V), SerA(G336V)

<400> 5

ES 2 711 830 T3

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

ES 2 711 830 T3

His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr  
 165 170 175  
 Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr  
 180 185 190  
 Gln Val Gln His Leu Ser Asp Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser  
 195 200 205  
 Leu His Val Pro Glu Asn Pro Ser Thr Lys Asn Met Met Gly Ala Lys  
 210 215 220  
 Glu Ile Ser Leu Met Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg  
 225 230 235 240  
 Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys  
 245 250 255  
 His Leu Ala Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Thr Glu Pro Ala Thr  
 260 265 270  
 Asn Ser Asp Pro Phe Thr Ser Pro Leu Cys Glu Phe Asp Asn Val Leu  
 275 280 285  
 Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile  
 290 295 300  
 Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Leu His Val  
 325 330 335  
 Gly Arg Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr  
 340 345 350  
 Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln  
 355 360 365  
 Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu  
 370 375 380  
 Ala Asp Glu Asp Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile  
 385 390 395 400  
 Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr  
 405 410

<210> 6  
 <211> 410  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

5

## ES 2 711 830 T3

<223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa(G336V, G337V), SerA(G336V, G337V)

<400> 6



ES 2 711 830 T3

Met Ala Lys Val Ser Leu Glu Lys Asp Lys Ile Lys Phe Leu Leu Val  
1 5 10 15

Glu Gly Val His Gln Lys Ala Leu Glu Ser Leu Arg Ala Ala Gly Tyr  
20 25 30

Thr Asn Ile Glu Phe His Lys Gly Ala Leu Asp Asp Glu Gln Leu Lys  
35 40 45

Glu Ser Ile Arg Asp Ala His Phe Ile Gly Leu Arg Ser Arg Thr His  
50 55 60

Leu Thr Glu Asp Val Ile Asn Ala Ala Glu Lys Leu Val Ala Ile Gly  
65 70 75 80

Cys Phe Cys Ile Gly Thr Asn Gln Val Asp Leu Asp Ala Ala Ala Lys  
85 90 95

Arg Gly Ile Pro Val Phe Asn Ala Pro Phe Ser Asn Thr Arg Ser Val  
100 105 110

Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Val Pro  
115 120 125

Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Val Trp Asn Lys Leu Ala Ala  
130 135 140

Gly Ser Phe Glu Ala Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly  
145 150 155 160

His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr  
165 170 175

Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr  
180 185 190

Gln Val Gln His Leu Ser Asp Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser  
195 200 205

Leu His Val Pro Glu Asn Pro Ser Thr Lys Asn Met Met Gly Ala Lys  
210 215 220

Glu Ile Ser Leu Met Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg  
225 230 235 240

Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys  
245 250 255

His Leu Ala Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Thr Glu Pro Ala Thr  
260 265 270

Asn Ser Asp Pro Phe Thr Ser Pro Leu Cys Glu Phe Asp Asn Val Leu  
275 280 285

Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile  
290 295 300

Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser  
305 310 315 320

ES 2 711 830 T3

Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Leu His Val  
 325 330 335

Val Arg Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr  
 340 345 350

Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln  
 355 360 365

Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu  
 370 375 380

Ala Asp Glu Asp Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile  
 385 390 395 400

Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr  
 405 410

5 <210> 7  
 <211> 410  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa(G336V, R338G), SerA(G336V, R338G)  
 <400> 7

ES 2 711 830 T3

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

ES 2 711 830 T3

His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr  
 165 170 175  
 Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Thr  
 180 185 190  
 Gln Val Gln His Leu Ser Asp Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser  
 195 200 205  
 Leu His Val Pro Glu Asn Pro Ser Thr Lys Asn Met Met Gly Ala Lys  
 210 215 220  
 Glu Ile Ser Leu Met Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg  
 225 230 235 240  
 Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys  
 245 250 255  
 His Leu Ala Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Thr Glu Pro Ala Thr  
 260 265 270  
 Asn Ser Asp Pro Phe Thr Ser Pro Leu Cys Glu Phe Asp Asn Val Leu  
 275 280 285  
 Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile  
 290 295 300  
 Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Leu His Val  
 325 330 335  
 Gly Gly Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr  
 340 345 350  
 Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln  
 355 360 365  
 Tyr Leu Gln Thr Ser Ala Gln Met Gly Tyr Val Val Ile Asp Ile Glu  
 370 375 380  
 Ala Asp Glu Asp Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile  
 385 390 395 400  
 Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr  
 405 410

<210> 8  
 <211> 362  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli K12 W3110  
 <220>

5

<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(362)  
<223> 3-fosfoserina/fosfohidroxitreonina aminotransferasa, SerC

5 <400> 8

ES 2 711 830 T3

Met Ala Gln Ile Phe Asn Phe Ser Ser Gly Pro Ala Met Leu Pro Ala  
 1 5 10 15

Glu Val Leu Lys Gln Ala Gln Gln Glu Leu Arg Asp Trp Asn Gly Leu  
 20 25 30

Gly Thr Ser Val Met Glu Val Ser His Arg Gly Lys Glu Phe Ile Gln  
 35 40 45

Val Ala Glu Glu Ala Glu Lys Asp Phe Arg Asp Leu Leu Asn Val Pro  
 50 55 60

Ser Asn Tyr Lys Val Leu Phe Cys His Gly Gly Gly Arg Gly Gln Phe  
 65 70 75 80

Ala Ala Val Pro Leu Asn Ile Leu Gly Asp Lys Thr Thr Ala Asp Tyr  
 85 90 95

Val Asp Ala Gly Tyr Trp Ala Ala Ser Ala Ile Lys Glu Ala Lys Lys  
 100 105 110

Tyr Cys Thr Pro Asn Val Phe Asp Ala Lys Val Thr Val Asp Gly Leu  
 115 120 125

Arg Ala Val Lys Pro Met Arg Glu Trp Gln Leu Ser Asp Asn Ala Ala  
 130 135 140

Tyr Met His Tyr Cys Pro Asn Glu Thr Ile Asp Gly Ile Ala Ile Asp  
 145 150 155 160

Glu Thr Pro Asp Phe Gly Ala Asp Val Val Val Ala Ala Asp Phe Ser  
 165 170 175

Ser Thr Ile Leu Ser Arg Pro Ile Asp Val Ser Arg Tyr Gly Val Ile  
 180 185 190

Tyr Ala Gly Ala Gln Lys Asn Ile Gly Pro Ala Gly Leu Thr Ile Val  
 195 200 205

Ile Val Arg Glu Asp Leu Leu Gly Lys Ala Asn Ile Ala Cys Pro Ser  
 210 215 220

Ile Leu Asp Tyr Ser Ile Leu Asn Asp Asn Gly Ser Met Phe Asn Thr  
 225 230 235 240

Pro Pro Thr Phe Ala Trp Tyr Leu Ser Gly Leu Val Phe Lys Trp Leu  
 245 250 255

Lys Ala Asn Gly Gly Val Ala Glu Met Asp Lys Ile Asn Gln Gln Lys  
 260 265 270

Ala Glu Leu Leu Tyr Gly Val Ile Asp Asn Ser Asp Phe Tyr Arg Asn  
 275 280 285

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

Ala Asp Ser Ala Leu Asp Lys Leu Phe Leu Glu Glu Ser Phe Ala Ala  
 305 310 315 320

ES 2 711 830 T3

Gly Leu His Ala Leu Lys Gly His Arg Val Val Gly Gly Met Arg Ala  
325 330 335

Ser Ile Tyr Asn Ala Met Pro Leu Glu Gly Val Lys Ala Leu Thr Asp  
340 345 350

Phe Met Val Glu Phe Glu Arg Arg His Gly  
355 360

<210> 9

<211> 323

5 <212> PRT

<213> Mycobacterium smegmatics str. MC2 155

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(323)

<223> Msm-OPSS

<400> 9

ES 2 711 830 T3

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



ES 2 711 830 T3

	195		200		205											
Glu	Pro	Arg	Tyr	Gly	Glu	Gly	Val	Tyr	Ala	Leu	Arg	Asn	Ile	Asp	Glu	
	210					215					220					
Gly	Phe	Ile	Pro	Glu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Asp	Val	Leu	Thr	Thr	Arg	Phe	
225					230					235					240	
Ser	Val	Gly	Ser	Phe	Asp	Ala	Val	Arg	Arg	Thr	Arg	Glu	Leu	Val	Thr	
				245					250						255	
Arg	Glu	Gly	Ile	Phe	Ala	Gly	Ile	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Leu	His	Ala	
			260					265						270		
Ala	Leu	Gly	Met	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Lys	Ala	Gly	Glu	Arg	Ala	Asp	
		275					280					285				
Ile	Ala	Phe	Val	Val	Ala	Asp	Ala	Gly	Trp	Lys	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gly	
	290					295					300					
Ala	Tyr	Ala	Gly	Ser	Leu	Asp	Asp	Ala	Glu	Asp	Ala	Leu	Glu	Gly	Gln	
305					310					315					320	

Leu Trp Ala

- <210> 10
- <211> 318
- 5 <212> PRT
- <213> Mycobacterium smegmatics str. MC2 155
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- 10 <222> (1)..(318)
- <223> Msm-T
- <400> 10

ES 2 711 830 T3

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

ES 2 711 830 T3

Leu Glu Leu Tyr Gly Ala Arg Ile Ile Phe Ser Pro Ala Glu Gly Gly  
 115 120 125

Ser Asn Thr Ala Val Ala Thr Ala Lys Glu Leu Ala Ala Gln Asn Pro  
 130 135 140

Ser Trp Val Met Leu Tyr Gln Tyr Gly Asn Pro Ala Asn Ser Asp Ala  
 145 150 155 160

His Tyr Phe Gly Thr Gly Pro Glu Leu Leu Ala Asp Leu Pro Glu Ile  
 165 170 175

Thr His Phe Val Ala Gly Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Met Gly Thr  
 180 185 190

Gly Arg Phe Leu Arg Glu His Val Pro Gly Val Gln Ile Val Ala Ala  
 195 200 205

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

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

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

Arg Glu Gly Ile Phe Ala Gly Ile Ser Thr Gly Ala Val Leu His Ala  
 260 265 270

Ala Leu Gly Met Ala Ala Lys Ala Val Lys Ala Gly Glu Arg Ala Asp  
 275 280 285

Ile Ala Phe Val Val Ala Asp Ala Gly Trp Lys Tyr Leu Ser Thr Gly  
 290 295 300

Ala Tyr Ala Gly Ser Leu Asp Asp Ala Glu Asp Ala Leu Glu  
 305 310 315

<210> 11  
 <211> 318  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis H37Rv

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(318)  
 <223> Mtb-T

<400> 11

ES 2 711 830 T3

Met	Thr	Arg	Tyr	Asp	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly	Asn	Thr	Pro	Leu
1				5					10					15	
Val	Gly	Leu	Gln	Arg	Leu	Ser	Pro	Arg	Trp	Asp	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly
			20					25					30		
Pro	His	Val	Arg	Leu	Trp	Ala	Lys	Leu	Glu	Asp	Arg	Asn	Pro	Thr	Gly
		35					40					45			

Ser Ile Lys Asp Arg Pro Ala Val Arg Met Ile Glu Gln Ala Glu Ala  
 50 55 60  
 Asp Gly Leu Leu Arg Pro Gly Ala Thr Ile Leu Glu Pro Thr Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Asn Thr Gly Ile Ser Leu Ala Met Ala Ala Arg Leu Lys Gly Tyr Arg  
 85 90 95  
 Leu Ile Cys Val Met Pro Glu Asn Thr Ser Val Glu Arg Arg Gln Leu  
 100 105 110  
 Leu Glu Leu Tyr Gly Ala Gln Ile Ile Phe Ser Ala Ala Glu Gly Gly  
 115 120 125  
 Ser Asn Thr Ala Val Ala Thr Ala Lys Glu Leu Ala Ala Thr Asn Pro  
 130 135 140  
 Ser Trp Val Met Leu Tyr Gln Tyr Gly Asn Pro Ala Asn Thr Asp Ser  
 145 150 155 160  
 His Tyr Cys Gly Thr Gly Pro Glu Leu Leu Ala Asp Leu Pro Glu Ile  
 165 170 175  
 Thr His Phe Val Ala Gly Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Met Gly Thr  
 180 185 190  
 Gly Arg Phe Leu Arg Glu His Val Ala Asn Val Lys Ile Val Ala Ala  
 195 200 205  
 Glu Pro Arg Tyr Gly Glu Gly Val Tyr Ala Leu Arg Asn Met Asp Glu  
 210 215 220  
 Gly Phe Val Pro Glu Leu Tyr Asp Pro Glu Ile Leu Thr Ala Arg Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Val Gly Ala Val Asp Ala Val Arg Arg Thr Arg Glu Leu Val His  
 245 250 255  
 Thr Glu Gly Ile Phe Ala Gly Ile Ser Thr Gly Ala Val Leu His Ala  
 260 265 270  
 Ala Leu Gly Val Gly Ala Gly Ala Leu Ala Ala Gly Glu Arg Ala Asp  
 275 280 285  
 Ile Ala Leu Val Val Ala Asp Ala Gly Trp Lys Tyr Leu Ser Thr Gly  
 290 295 300  
 Ala Tyr Ala Gly Ser Leu Asp Asp Ala Glu Thr Ala Leu Glu  
 305 310 315

<210> 12  
 <211> 389

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Ape-OPSS

<400> 12

ES 2 711 830 T3

Met Ala Leu Ala Asp Ile Ser Gly Tyr Leu Asp Val Leu Asp Ser Val  
1 5 10 15

Arg Gly Phe Ser Tyr Leu Glu Asn Ala Arg Glu Val Leu Arg Ser Gly  
20 25 30

Glu Ala Arg Cys Leu Gly Asn Pro Arg Ser Glu Pro Glu Tyr Val Lys  
35 40 45

Ala Leu Tyr Val Ile Gly Ala Ser Arg Ile Pro Val Gly Asp Gly Cys  
50 55 60

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

Glu Met Val Phe Pro Ser Pro Leu Asp Phe Phe Glu Arg Gly Lys Pro  
85 90 95

Thr Pro Leu Val Arg Ser Arg Leu Gln Leu Pro Asn Gly Val Arg Val  
100 105 110

Trp Leu Lys Leu Glu Trp Tyr Asn Pro Phe Ser Leu Ser Val Lys Asp  
115 120 125

Arg Pro Ala Val Glu Ile Ile Ser Arg Leu Ser Arg Arg Val Glu Lys  
130 135 140

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

Ser Ala Val Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Arg Ala Arg Val Tyr Leu Pro  
165 170 175

Gly Ala Ala Glu Glu Phe Gly Lys Leu Leu Pro Arg Leu Leu Gly Ala  
180 185 190

Gln Val Ile Val Asp Pro Glu Ala Pro Ser Thr Val His Leu Leu Pro  
195 200 205

Arg Val Met Lys Asp Ser Lys Asn Glu Gly Phe Val His Val Asn Gln  
210 215 220

Phe Tyr Asn Asp Ala Asn Phe Glu Ala His Met Arg Gly Thr Ala Arg  
225 230 235 240

Glu Ile Phe Val Gln Ser Arg Arg Gly Gly Leu Ala Leu Arg Gly Val  
245 250 255

Ala Gly Ser Leu Gly Thr Ser Gly His Met Ser Ala Ala Ala Phe Tyr  
260 265 270

Leu Gln Ser Val Asp Pro Ser Ile Arg Ala Val Leu Val Gln Pro Ala  
275 280 285

Gln Gly Asp Ser Ile Pro Gly Ile Arg Arg Val Glu Thr Gly Met Leu  
290 295 300

ES 2 711 830 T3

Trp Ile Asn Met Leu Asp Ile Ser Tyr Thr Leu Ala Glu Val Thr Leu  
 305 310 315 320

Glu Glu Ala Met Glu Ala Val Val Glu Val Ala Arg Ser Asp Gly Leu  
 325 330 335

Val Ile Gly Pro Ser Gly Gly Ala Ala Val Lys Ala Leu Ala Lys Lys  
 340 345 350

Ala Ala Glu Gly Asp Leu Glu Pro Gly Asp Tyr Val Val Val Val Pro  
 355 360 365

Asp Thr Gly Phe Lys Tyr Leu Ser Leu Val Gln Asn Ala Leu Glu Gly  
 370 375 380

Ala Gly Asp Ser Val  
 385

5 <210> 13  
 <211> 1341  
 <212> ADN  
 <213> Corynebacterium glutamicum 13032

10 <220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(1341)  
 <223> serB

<400> 13



ES 2 711 830 T3

atgtcgtggt ccgcgctcag acatgagaca attgttgccg tgactgaact catccagaat  
60

gaatcccaag aaatcgctga gctggaagcc ggccagcagg ttgcattgcg tgaaggttat  
120

cttctgcggt tgatcacagt gagcggtaaa gaccgccag gtgtgactgc cgcgttcttt  
180

agggtcttgt ccgctaata ggttcaggtc ttggacgttg agcagtcaat gttccgtggc  
240

tttttgaact tggcggcggt tgtgggtatc gcacctgagc gtgtcgagac cgtcaccaca  
300

ggcctgactg acaccctcaa ggtgcatgga cagtccgtgg tggaggagct gcaggaaact  
360

gtgcagtcgt cccgtcctcg ttcttcccat gttggtgtgg tggtaggtga tccggttgat  
420

gcgttgata tttcccgcatt tggtcagacc ctggcggatt acgatgcca cattgacacc  
480

attcgtggta tttcggatta ccctgtgacc ggctggagc tgaaggtagc tgtgccggat  
540

gtcagccctg gtggtaggtga agcagatcgt aaggcgttg ctgctcttac ctctgagctg  
600

ES 2 711 830 T3

aatgtggata ttgcgattga gcgttctggt ttgctgcgtc gttctaagcg tctgggtgtgc  
660

ttcgattgtg attccacggt gatcactggt gaggtcattg agatgctggc ggctcacgcg  
720

ggcaaggaag ctgaagttgc ggcagttact gagcgtgcga tgcgcggtga gctcgatttc  
780

gaggagtctc tgcgtgagcg tgtgaaggcg ttggctgggt tggatgcgtc ggtgatcgat  
840

gaggtcgtg ccgctattga gctgaccctt ggtgctgcga ccacgatccg tacgctgaac  
900

cgcatggggt accagaccgc tgttgtttcc ggtggtttca tccagggtgtt ggaagggttg  
960

gctgaggagt tggagttgga ttatgtccgc gccaacactt tggaaatcgt tgatggcaag  
1020

ctgaccggca acgtcaccgg aaagatcgtt gaccgcgctg cgaaggctga gttcctccgt  
1080

gagttcgtg cggattctgg cctgaagatg taccagactg tcgctgtcgg tgatggcgct  
1140

aatgacatcg atatgctctc cgctgctgggt ctgggtggtt ctttcaacgc gaagcctgcg  
1200

ctgaaggaga ttgcggatac ttccgtgaac caccattcc tcgacgaggt tttgcacatc  
1260

atgggcattt cccgcgacga gatcgatctg gcggatcagg aagacggcac tttccaccgc  
1320

gttccattga ccaatgccta a  
1341

<210> 14  
<211> 1593  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> serA\*(E235K)

<400> 14

ES 2 711 830 T3

atgagccaga atggccgtcc ggtagtcctc atcgccgata agcttgcgca gtccactggt  
60

gacgcgcttg gagatgcagt agaagtcctg tgggttgacg gacctaaccg ccagaactg  
120

cttgatgcag ttaaggaagc ggacgcactg ctcgtgcggt ctgctaccac tgcgatgct  
180

ES 2 711 830 T3

gaagtcacg ccgctgcccc taacttgaag atcgtcggtc gtgccggcgt gggcttgac  
240

aacgttgaca tcctgctgc cactgaagct ggcgtcatgg ttgctaacgc accgacctct  
300

aatattcact cgccttgtga gcacgcaatt tctttgctgc tgtctactgc tcgccagatc  
360

cctgctgctg atgacgacgt gcgtgagggc gagggtgaagc ggtcttcttt caacgggtgtg  
420

gaaatcttcg gaaaaactgt cggatcgtc ggttttggcc acatttgtca gttgtttgc  
480

cagcgtcttg ctgcgtttga gaccaccatt gttgcttacg atccttacgc taaccctgct  
540

cgtgcggctc agctgaacgt tgagttggtt gagggtgatg agctgatgag ccgttctgac  
600

tttgtcacca ttcaccttcc taagaccaag gaaactgctg gcatgtttga tgcgcagctc  
660

cttgctaagt ccaagaaggg ccagatcatc atcaacgctg ctcgtggtgg ccttgttgat  
720

gagcaggctt tggctgatgc gattgagtc ggtcacattc gtggcgctgg ttcgatgtg  
780

tactccaccg agccttgac tgattctcct ttgttcaagt tgcctcaggt tgttgtagct  
840

cctcacttgg gtgcttctac tgaagaggct caggatcgtg cgggtactga cgttgctgat  
900

tctgtgctca aggcgctggc tggcgagttc gtggcggatg ctgtgaacgt ttccgggtgg  
960

cgcgtgggcg aaaaggttgc tgtgtggatg gatctggctc gcaagcttgg tcttcttgc  
1020

ggcaagcttg tcgacgccgc cccagtctcc attgaggttg aggctcgagg cgagctttct  
1080

tccgagcagg tcgatgcact tggtttgcct gctgttcgtg gtttgttctc cggaattatc  
1140

gaagagtccg ttactttcgt caacgctcct cgcattgctg aagagcgtgg cctggacatc  
1200

tccgtgaaga ccaactctga gtctgttact caccgttccg tcctgcaggt caaggctatt  
1260

actggcagcg gcgcgagcgc aactgttgtt ggtgccctga ctggtcttga gcgcgttgag  
1320

aagatcaccg gcatcaatgg ccgtggcctg gatctgcgcg cagaggtctt gaacctcttc  
1380

ES 2 711 830 T3

ctgcagtaca ctgacgctcc tgggtgactg ggtaccgttg gtaccaagct gggtgctgct  
1440

ggcatcaaca tcgaggctgc tgcgcttgact caggctgaga agggtgacgg cgctgtcctg  
1500

atcctgctg ttagtccgc tgtctctgaa gagctggaag ctgaaatcaa cgctgagttg  
1560

ggtgctactt ccttccaggt tgatcttgac taa  
1593

<210> 15

<211> 1002

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> serA\*(197 delta)

<400> 15

ES 2 711 830 T3

atgagccaga atggccgtcc ggtagtcctc atcgccgata agcttgccga gtccactgtt  
60

gacgcgcttg gagatgcagt agaagtcctg tggggtgacg gacctaaccg cccagaactg  
120

cttgatgcag ttaaggaagc ggacgcactg ctcggtcggtt ctgctaccac tgtcgatgct  
180

gaagtcacgc ccgctgcccc taacttgaag atcgtcggtc gtgccggcgt gggcttgac  
240

aacgttgaca tccctgctgc cactgaagct ggcgtcatgg ttgctaaccg accgacctct  
300

aatattcact ccgcttgtga gcacgcaatt tctttgctgc tgtctactgc tcgccagatc  
360

cctgctgctg atgcgacgct gcgtgagggc gagtggaagc ggtcttcttt caacgggtgtg  
420

gaaatthtcg gaaaaactgt cggtatcgtc ggtthtgcc acattggtca gttgthtgc  
480

cagcgtcttg ctgcgtthga gaccaccatt gthgcttacg atccttacgc taaccctgct  
540

cgtgcggctc agctgaacgt tgagthggtt gagthgatg agctgatgag ccgthctgac  
600

thtgcacca thcacctthc taagaccaag gaaactgctg gcatgthtga tgcgcagctc  
660

cttgctaatg ccaagaaggg ccagatcatc atcaacgctg ctcgthggtg cthtthtgat  
720

gagcaggctt tggctgatgc gathgagthc gthcacathc thggcgctgg thtctgatgtg  
780

tactccaccg agcctthcac thgathctct ththtcaagt thcctcaggt thtthtgact  
840

cctcactthg thgctthctac thgaagaggct cagthctgtg cggthactga cthtthtgat  
900

thtthtctca aggcgctggc thggcgagthc thggcggatg ctthtgaacgt thccgthggt  
960

cgctggggc aagagthtgc thtthtggatg gathctggctt aa  
1002

<210> 16  
<211> 969

ES 2 711 830 T3

<212> ADN  
<213> Escherichia coli K12 W3110

<220>  
<221> gen  
<222> (1)..(969)  
<223> serB

<400> 16

5

10

atgcctaaca ttacctgggtg cgacctgcct gaagatgtct ctttatggcc gggctctgcct  
60

ctttcattaa gtggatgatga agtgatgccca ctggattacc acgcaggctcg tagcggctgg  
120

ctgctgtatg gtcgtgggct ggataaacia cgtctgaccc aataccagag caaactgggt  
180

gcgcgatgg tgattgttgc cgctgggtgc gtggaagatt atcaggtgat tcgtctggca  
240

ggttcactca ccgcacgggc tacacgcctg gccacgaag cgcagctgga tgcgccccg  
300

ctggggaaaa tcccgcacct gcgcacgccc ggtttgctgg tgatggatat ggactccacc  
360

gcatccaga ttgaatgtat tgatgaaatt gccaaactgg ccggaacggg cgagatgggtg  
420

gcggaagtaa ccgaacgggc gatgcgcggc gaactcgatt ttaccgccag cctgcgcagc  
480

cgtgtggcga cgctgaaagg cgctgacgcc aatattctgc aacaggtgcg tgaaaatctg  
540

ccgctgatgc caggcttaac gcaactgggtg ctcaagctgg aaacgctggg ctggaaagtg  
600

gcgattgcct ccggcggctt tactttcttt gctgaatacc tgcgcgacaa gctgcgcctg  
660

ES 2 711 830 T3

accgccgtgg tagccaatga actggagatc atggacggta aatttaccgg caatgtgatc  
720

ggcgacatcg tagacgcgca gtacaaagcg aaaactctga ctcgcctcgc gcaggagtat  
780

gaaatcccgc tggcgcagac cgtggcgatt ggcgatggag ccaatgacct gccgatgatc  
840

aaagcggcag ggctggggat tgcctaccat gccaaagcaa aagtgaatga aaaggcggaa  
900

gtcaccatcc gtcacgctga cctgatgggg gtattctgca tcctctcagg cagcctgaat  
960

cagaagtaa  
969

5 <210> 17  
<211> 1233  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli K12 W3110

10 <220>  
<221> gen  
<222> (1)..(1233)  
<223> serA

<400> 17



ES 2 711 830 T3

atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac  
60

caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc  
120

gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga  
180

tcccgtaccc atctgactga agacgtgatc aacgccgcag aaaaactggt cgctattggc  
240

tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg  
300

gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctgttgcgg agctggtgat tggcgaactg  
360

ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac  
420

aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt  
480

catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat  
540

gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg  
600

ES 2 711 830 T3

ctgaatatga gcgatgtggt gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg  
660

atgggcgcgga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc  
720

ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg  
780

gcggaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg  
840

ctgtgtgaat tcgacaacgt ccttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg  
900

caggagaata tcggcctgga agttgcgggg aaattgatca agtattctga caatggctca  
960

acgctctctg cggggaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgggtg gcgtcgtctg  
1020

atgcacatcc acgaaaaccg tccgggctg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag  
1080

cagggcgctca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt  
1140

attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt  
1200

ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa  
1233

- 5 <210> 18
- <211> 1233
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> serA\*(G336V)
  
- <400> 18

ES 2 711 830 T3

atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac  
60

caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc  
120

gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga  
180

tcccgtaacc atctgactga agacgtgatc aacgccgcag aaaaactggt cgctattggc  
240

tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatccccg  
300

ES 2 711 830 T3

gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctgttgcgg agctggtgat tggcgaactg  
360

ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac  
420

aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt  
480

catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat  
540

gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg  
600

ctgaatatga gcgatgtggt gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg  
660

atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc  
720

ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg  
780

gcggaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg  
840

ctgtgtgaat tcgacaacgt ctttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg  
900

caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca  
960

acgctctctg cgggtgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgttgg gcgtcgtctg  
1020

atgcacatcc acgaaaaccg tccgggcgtg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag  
1080

cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt  
1140

attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt  
1200

ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa  
1233

<210> 19

<211> 1233

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> serA\*(G336V,G337V)

5

ES 2 711 830 T3

<400> 19

atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac

5

ES 2 711 830 T3

60

caaaagggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc  
120

gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga  
180

tcccgtaccc atctgactga agacgtgatc aacgccgcag aaaaactggc cgctattggc  
240

tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg  
300

gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctggtgcgg agctggatg tggcgaactg  
360

ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac  
420

aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt  
480

catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat  
540

gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg  
600

ctgaatatga gcgatgtggc gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg  
660

atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc  
720

ggactgtggc tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg  
780

gcggaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg  
840

ctgtgtgaat tcgacaacgt ccttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg  
900

caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca  
960

acgtctctcg cggatgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgttgt gcgtcgtctg  
1020

atgcacatcc acgaaaaccg tccgggcgtg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag  
1080

cagggcgtca acatcgcgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt  
1140

attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt  
1200

ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa

1233

# ES 2 711 830 T3

<210> 20  
<211> 1233  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> serA\*(G336V,R338G)  
  
10 <400> 20

ES 2 711 830 T3

atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac  
60

caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc  
120

gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga  
180

tcccgtaccc atctgactga agacgtgatc aacgccgcag aaaaactggc cgctattggc  
240

tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg  
300

gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctggtgcgg agctggatg tggcgaactg  
360

ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac  
420

aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt  
480

catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat  
540

gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg  
600

ctgaatatga gcgatgtggt gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg  
660

atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc  
720

ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg  
780

gcggcaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg  
840

ctgtgtgaat tcgacaacgt ccttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg  
900

caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca  
960



ES 2 711 830 T3

acgctctctg cggatgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgttgg gggtcgctctg  
1020

atgcacatcc acgaaaaccg tccgggctg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag  
1080

cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt  
1140

attgatattg aagccgacga agacggtgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt  
1200

ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa  
1233

- <210> 21
- <211> 1089
- 5 <212> ADN
- <213> Escherichia coli K12 W3110
  
- <220>
- <221> gen
- 10 <222> (1)..(1089)
- <223> serC
  
- <400> 21

ES 2 711 830 T3

atggctcaaa tcttcaattt tagttctggt cgggcaatgc taccggcaga ggtgcttaa  
60

caggctcaac aggaactgcg cgactggaac ggtcttgga cgtcgggat ggaagtgagt  
120

caccgtggca aagagttcat tcaggttgca gaggaagccg agaaggattt tcgcatctt  
180

cttaatgtcc cctccaacta caaggtatta ttctgccatg gcggtggtcg cggtcagttt  
240

gctgcggtac cgctgaatat tctcgggatg aaaaccaccg cagattatgt tgatgccggt  
300

tactgggagg caagtgccat taaagaagcg aaaaaatact gcacgcctaa tgtctttgac  
360

gccaaagtga ctggtgatgg tctgcgagcg gttaagccaa tgcgtgaatg gcaactctct  
420

gataatgctg cttatatgca ttattgcccg aatgaaacca tcgatgggat cgccatcgac  
480

gaaacgccag acttcggcgc agatgtggtg gtcgccgctg acttctcttc aaccattctt  
540

tcccgtccga ttgacgtcag ccgttatggt gtaatttacg ctggcgcgca gaaaaatctc  
600

ggcccggctg gcctgacaat cgatcatggt cgtgaagatt tgctgggcaa agcgaatctc

660

gcgtgtccgt cgattctgga ttattccatc ctcaacgata acggctccat gtttaacacg  
720

ccgccgacat ttgcctggta tctatctggt ctggtcttta aatggctgaa agcgaacggc  
780

ggtgtagctg aatggataa aatcaatcag caaaaagcag aactgctata tggggtgatt  
840

gataacagcg atttctaccg caatgacgtg gcgaaagcta accgttcgcg gatgaacgtg  
900

ccgttccagt tggcggacag tgcgcttgac aaattgttcc ttgaagagtc ttttgctgct  
960

ggccttcatg cactgaaagg tcaccgtgtg gtcggcggaa tgcgcgcttc tatttataac  
1020

gccatgccgc tggaaggcgt taaagcgtg acagacttca tggttgagtt cgaacgccgt  
1080

**cacggttaa**  
1089

5 <210> 22  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de serB  
<400> 22

**gcgatatcat gaccttagaa tgggtg**  
26

15 <210> 23  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de serB  
<400> 23

**gctctagatc acgcatgcct cgc**  
23

25  
30 <210> 24  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de serB

ES 2 711 830 T3

<400> 24

**gcgatatcat gtcaccctg tgaaaatgac  
30**

5

<210> 25  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de serB

15

<400> 25

**gctctagatc agttcgatac ctggggtat  
29**

20

<210> 26  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de serB

<400> 26

**atcatggtac tggcaggcgc tacc  
24**

30

<210> 27  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de serB

<400> 27

40

**gctctagatt acaaagtgaa agagagacg  
29**

45

<210> 28  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50

<220>  
<223> cebador para la construcción de serA\*

<400> 28

**acgatatcat gagccagaat ggccgt  
26**

55

<210> 29  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 711 830 T3

<223> cebador para la construcción de serA\*

<400> 29

5 **cgtctagatt agtcaagatc aacctgga**  
**28**

<210> 30

<211> 41

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para la construcción de serA\*(E325K)

15 <400> 30

**atccatccac acagcaacct ttctgcccac gcgaccaccg g**  
**41**

<210> 31

20 <211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> cebador para la construcción de serA\*(E325K)

<400> 31

**ccggtggtcg cgtgggcgaa aaggttgctg tgtggatgga t**  
**41**

30

<210> 32

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> cebador para la construcción de serA\* (197 delta)

<400> 32

40

**cgtctagatt aagccagatc catccacaca g**  
**31**

<210> 33

<211> 70

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para la eliminación del casete de serB

50

<400> 33

**atgcctaaca ttacctggtg cgacctgcct gaagatgtct ctttatggcc gtgtaggctg**  
**60**

**gagctgcttc**  
**70**

55 <210> 34

<211> 70

ES 2 711 830 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de serB

<400> 34

**ggatggcggg ccaccaatta cttctgattc aggctgcctg agaggatgca catatgaata**  
**60**

**tcctccttag**  
**70**

10 <210> 35  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> cebador para la amplificación de pself-serB para construir pBAC-pself-serB

20 <400> 35

**cccaagcttc ttccaccctt tgaaaat**  
**27**

25 <210> 36  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> cebador para la amplificación de pself-serB para construir pBAC-pself-serB

<400> 36

**cccaagcttt tacttctgat tcaggct**  
**27**

35 <210> 37  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> cebador para la amplificación de pself-CTG-serB para construir pBAC-pself-CTG-serB

<400> 37

**ggagccttac tgcctaaca**  
**19**

45 <210> 38  
<211> 19  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la amplificación de pself-CTG-serB para construir pBAC-pself-CTG-serB

55 <400> 38

**tgttaggcag taaggctcc**  
**19**

5 <210> 39  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador para la construcción de serA\*  
<400> 39

**agggcgtggt gaccgataat**  
**20**

15 <210> 40  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> cebador para la construcción de serA\*  
<400> 40  
cctagagctc cattctggct gaatcgct

25 **28**

30 <210> 41  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> cebador para la construcción de serA\*  
<400> 41

**acggatcccc cctgagactg actggt**  
**26**

40 <210> 42  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> cebador para la construcción de serA\*(G336V)  
<400> 42

**tctcgtgccc actgcacggtt gggcgtcgtc tgatgca**  
**37**

50 <210> 43  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> cebador para la construcción de serA\*(G336V)  
60 <400> 43

**tgcatcagac gacgcccaac gtgcagtggc agcgaga**  
**37**

5 <210> 44  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador para la construcción de serA\*(G336V, G337V)  
  
<400> 44

**cgctgccact gcacgttgtg cgtcgtctga tgcacat**  
**37**

15 <210> 45  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> cebador para la construcción de serA\*(G336V, G337V)  
  
<400> 45

**atgtgcatca gacgacgcac aacgtgcagt ggcagcg**  
**37**

25 <210> 46  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> cebador para la construcción de serA\*(G336V, R338G)  
  
<400> 46

**ctgccactgc acgttgtggg tcgtctgatg cacatcc**  
**37**

35 <210> 47  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> cebador para la construcción de serA\*(G336V, R338G)  
  
<400> 47

**ggatgtgcat cagacgaccc acaacgtgca gtggcag**  
**37**

45 <210> 48  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> cebador para la amplificación de serA para construir pCL-Prmf-serA



ES 2 711 830 T3

<400> 48

**gatatcatgg caaaggtatc gctggaga  
28**

5 <210> 49  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador para la amplificación de serA para construir pCL-Prmf-serA

<400> 49

**aagcttttag tacagcagac gggcgc  
26**

15 <210> 50  
<211> 24  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la amplificación de serA para construir pCL-Prmf-serC

25 <400> 50

**gatatcatgg ctcaaattctt caat  
24**

30 <210> 51  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> cebador para la amplificación de serA para construir pCL-Prmf-serC

<400> 51

**ccaagcttt taaccgtgac ggcgttc  
27**

40 <210> 52  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> cebador para la amplificación de serA para construir pCL-Prmf-serA-(RBS)serC

<400> 52

50 **aagcttacgc aacgtggtga gggg  
24**

55 <210> 53  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de phnCDE

ES 2 711 830 T3

<400> 53

**atgcaaacga ttatccgtgt cgagaagctc gccaaaacct tcaatcagca gtgtaggctg**  
**60**

**gagctgcttc**  
**70**

5

<210> 54  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de phnCDE

15

<400> 54

**tcagataaag tgcttacgca accgttgaga gaggaaatcc agcaggctga catatgaata**  
**60**

**tcctccttag**  
**70**

20

<210> 55  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de phoA

<400> 55

**gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccggttac tgtttaccce gtgtaggctg**  
**60**

**gagctgcttc**  
**70**

30

<210> 56  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de phoA

<400> 56

**ttatttcagc cccagagcgg ctttcatggt gtagaagaga tcggtctggt catatgaata**  
**60**

40

**tcctccttag**  
**70**

45

<210> 57  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

ES 2 711 830 T3

<220>

<223> cebador para la eliminación del casete de aphA

<400> 57

5

**atgcgcaaga tcacacaggc aatcagtgcc gtttgcttat tgttcgctct gtgtaggctg  
60**

**gagctgcttc**

**70**

<210> 58

<211> 70

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para la eliminación del casete de aphA

15

<400> 58

**tcagtattct gaattgacga tcacctcttc accaaacgca cccgcttggtg catatgaata  
60**

**tcctccttag**

**70**

20

<210> 59

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> cebador para promover el remplazo del casete de pntAB

<400> 59

**tatcacattc cttaagccaa ttttaatcct gctcaaatga ccgtctatgc aggtgacact  
60**

**atagaacgcg**

**70**

30

<210> 60

<211> 67

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para promover el remplazo del casete de pntAB

40

<400> 60

**gcaacacggg ttccattggt taaccgttct cttgggtatgc caattcgcat ggtctgtttc  
60**

**ctgtgtg**

**67**

45

<210> 61

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 711 830 T3

<220>

<223> cebador para la amplificación de gdhA para construir pccIBAC-P(nativo)-gdhA

5 <400> 61

**cgaagcttgt ctctgctact gataacgg  
28**

<210> 62

10 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador para la amplificación de gdhA para construir pccIBAC-P(nativo)-gdhA

<400> 62

**cgaagcttgg gagcatcatc cgtaa  
26**

20

<210> 63

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> cebador para la amplificación de ydeD para construir pCL-Prmf-ydeD

<400> 63

30

**aagatatcat gtcgcgaaaa gatgggggt  
28**

<210> 64

35 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> cebador para la amplificación de ydeD para construir pCL-Prmf-ydeD

<400> 64

**ccaagcttg tgccaatgtc gtggttggt  
29**

45

<210> 65

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> cebador para la amplificación de yfiK para construir pCL-Prmf-yfiK

<400> 65

**aagatatcgt gacaccgacc cttttaag  
28**

55

<210> 66

<211> 29

<212> ADN

ES 2 711 830 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para la amplificación de yfiK para construir pCL-Prmf-yfiK

5

<400> 66

**cccaagctta ccatccgtgt atccggta  
29**

10

<210> 67

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> cebador para la amplificación de rhtB para construir pCL-Prmf-rhtB

<400> 67

**gcgatatcat gaccttagaa tggtagg  
26**

20

<210> 68

<211> 23

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para la amplificación de rhtB para construir pCL-Prmf-rhtB

30

<400> 68

**gctctagatc acgcatgcct cgc  
23**

35

<210> 69

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> cebador para la amplificación de rhtC para construir pCL-Prmf-rhtC

<400> 69

**gcgatatcat gttgatgta tttctcaccg tc  
32**

45

<210> 70

<211> 32

<212> ADN

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para la amplificación de rhtC para construir pCL-Prmf-rhtC

55

<400> 70

**gctctagatc accgcgaaat aatcaaatga at  
32**

<210> 71

<211> 24

# ES 2 711 830 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> cebador para la amplificación de asrB para construir pCL-Prmf-asrB

<400> 71

**atcatgttac tggcaggcgc tatic**  
**24**

10 <210> 72  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> cebador para la amplificación de asrB para construir pCL-Prmf-asrB

<400> 72

20 **gctctagatt acaaagtgaa agagagacg**  
**29**

25 <210> 73  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> cebador para la amplificación de livHM para construir pCL-Prmf-livHM

<400> 73

**gcgatatcat gtctgagcag tttttgtat**  
**29**

35 <210> 74  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> cebador para la amplificación de livHM para construir pCL-Prmf-livHM

<400> 74

45 **gctctagatc atgcttgctc tcctttcgc**  
**29**

50 <210> 75  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de gpmA

55 <400> 75

**gtgtaggctg gagctgcttc tataatgaga attattatca ttaaagatg atttgaggag**  
**60**

**taagtatatg**  
**70**

5 <210> 76  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de gpmA  
<400> 76

**catatgaata tcctccttag tcggctttct cattttaaac gaatgacggt tacttgcgtt**  
**60**

**taccctgggt**  
**70**

15 <210> 77  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> cebador para la amplificación de gpml para construir pSG76C-gpml  
<400> 77

25 **acggatcccg agcggtcgta tatttt**  
**26**

30 <210> 78  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> cebador para la amplificación de gpml para construir pSG76C-gpml implicado en el codón de parada  
<400> 78

**cagcgcggca aatttttctt actatttttt cagcgaggat tca**  
**43**

40 <210> 79  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> cebador para la amplificación de gpml para construir pSG76C-gpml implicado en el codón de parada  
<400> 79

**tgaatcctcg ctgaaaaaat agtaagaaaa atttgccgcg ctg**  
**43**

50 <210> 80  
<211> 28

ES 2 711 830 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> cebador para la amplificación de gpml para construir pSG76C-gpml

<400> 80

**cctagagctc aacgactctt ctacgcca**  
**28**

10 <210> 81  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de gpmB

20 <400> 81

**gcatgttaca ggtataccta gtccgccacg gtgaaacgca gtggaacgcc gtgtaggctg**  
**60**

**gagctgcttc**  
**70**

25 <210> 82  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de gpmB

<400> 82

**tcccctgcfg tttcaacgac ccagccagac gccagccaca ggctttcctg catatgaata**  
**60**

**tcctccttag**  
**70**

35 <210> 83  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de kbl

<400> 83

**aagtttgggt aatatgtgct ggaatttgcc ctgtctggag aatcgcaatg gtgtaggctg**  
**60**

45 <210> 84  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <210> 84  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial



ES 2 711 830 T3

<220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de kbl

5 <400> 84

**agtttggata acgctttcat ctcacatcct cagggcataa cgcccagttg catatgaata**

60

**tcctccttag**  
70

10 <210> 85  
<211> 73  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de sdaA

<400> 85

**gtgtattagt tcgttactgg aagtccagtc accttgtcag gagtattatc gtggtgtagg**  
60

**ctggagctgc ttc**  
73

20 <210> 86  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de sdaA

<400> 86

30 **atccgttgca gatgggcgag taagaagtat tagtcacact ggactttgat catatgaata**  
60

**tcctccttag**  
70

35 <210> 87  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de iclR

<400> 87

**atggtcgcac ccattcccgc gaaacgcggc agaaaacccg ccgttgccac gtgtaggctg**  
60

**gagctgcttc**  
70

45 <210> 88

ES 2 711 830 T3

<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> cebador para la eliminación del casete de iclR

<400> 88

**tcagcgcatt ccaccgtacg ccagcgtcac ttccttcgcc gctttaatca catatgaata**  
**60**

10 **tcctccttag**  
**70**

<210> 89  
<211> 21  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la amplificación de acs para construir pCL-Prmf-ac

20 <400> 89

**actatgagcc aaattcacia a**  
**21**

25 <210> 90  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> cebador para la amplificación de acs para construir pCL-Prmf-ac

<400> 90

**ccaagcttt tacgatggca tcgcat**  
**27**

35 <210> 91  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> cebador para la amplificación de poxB para construir pCL-Prmf-poxB

45 <400> 91

**actatgaaac aaacggttgc agct**  
**24**

50 <210> 92  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> cebador para la amplificación de poxB para construir pCL-Prmf-poxB

<400> 92

ES 2 711 830 T3

**cccaagcttt taccttagcc agtttgtttt**  
**30**

5 <210> 93  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador para la amplificación de ackA-pta para construir pCL-Prmf-ackA-pta  
<400> 93

**atcatgtcga gtaagttagt a**  
**21**

15 <210> 94  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> cebador para la amplificación de ackA-pta para construir pCL-Prmf-ackA-pta  
<400> 94

**cccaagcttt tactgctgct gtgcaga**  
**27**

25 <210> 95  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> cebador para la amplificación de aceBA para construir pCL-Prmf-aceBA  
<400> 95

**actatgactg aacaggcaac aaca**  
**24**

40 <210> 96  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> cebador para la amplificación de aceBA para construir pCL-Prmf-aceBA  
<400> 96

**cccaagcttc tacgttcggc aacggctgta**  
**30**

50 <210> 97  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> cebador para la amplificación de pckA para construir pCL-Prmf-pckA  
<400> 97

ES 2 711 830 T3

**actatgcgcg ttaacaatgg tttg  
24**

5 <210> 98  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador para la amplificación de pckA para construir pCL-Prmf-pckA  
  
<400> 98

**cccaagctta taaacgggag gcgaaggtgc  
30**

15 <210> 99  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> cebador para la amplificación de glcB para construir pCL-Prmf-glcB  
  
<400> 99

25 **atcatgagtc aaaccataac ccag  
24**

30 <210> 100  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> cebador para la amplificación de glcB para construir pCL-Prmf-glcB  
  
<400> 100

**cccaagcttt taatgacttt ctttttcgcg  
30**

40 <210> 101  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> cebador para la amplificación de maeB para construir pCL-Prmf-maeB  
  
<400> 101

50 **atcatggatg accagttaaa a  
21**

55 <210> 102  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la amplificación de maeB para construir pCL-Prmf-maeB

ES 2 711 830 T3

<400> 102

**cccaagcttt tacagcggtt gggtttg**  
**27**

5 <210> 103  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador para la construcción de gcl

<400> 103

15 **atcatggcaa aatgagagc c**  
**21**

20 <210> 104  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la construcción de gcl

25 <400> 104

**gcgcaagctt ttattcatag tgc**  
**23**

30 <210> 105  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> cebador para la construcción de glxR-glxK

<400> 105

**gcgcgatatc atgaaactgg ga**  
**22**

40 <210> 106  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> cebador para la construcción de glxR-glxK

<400> 106

50 **ataaactggc ctgatctaga ttgttgaaa aagg**  
**34**

55 <210> 107  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la construcción de glxR-glxK

ES 2 711 830 T3

<400> 107

**cctttttcaa caaatctaga tcaggccagt ttat  
34**

5

<210> 108  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> cebador para la construcción de glxR-glxK

15

**ggcaagctta ttgcggccgc ttagttttta at  
32**

20

<210> 109  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> cebador directo para Ape-OPSS  
<400> 109

**gtcatatgat ggctctggct gacatctct  
29**

30

<210> 110  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> cebador inverso para Ape-OPSS  
<400> 110

**gtaagctttt aaacagagtc accagcacc  
29**

40

<210> 111  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> cebador directo para Mtb-OPSS  
<400> 111

**gtcatatgat gacacgatac gactcgctg  
29**

50

<210> 112  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 711 830 T3

<223> cebador inverso para Mtb-OPSS

<400> 112

5 **gtaagctttc atgcccatag ttgcccttc**  
**29**

<210> 113

<211> 29

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo para Msm-OPSS

15 <400> 113

**ataagctttc atgcccatag ctgcccttc**  
**29**

<210> 114

20 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> cebador inverso para Msm-OPSS

<400> 114

**ataagctttc attccagcgc gtcctcggc**  
**29**

30 <210> 115

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> cebador directo para Rjo-OPSS

<400> 115

40 <210> 116

**gtcatatgat ggcgcggttc gattcgctg**  
**29**

<210> 116

45 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> cebador inverso para Rjo-OPSS

<400> 116

**tagcggccgc tcatgccac aactgccctt c**  
**31**

55 <210> 117

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 711 830 T3

<220>  
<223> cebador directo para Nfa-OPSS

<400> 117

5

**gtcatatgat ggcacgctac gaatcgctg  
29**

<210> 118  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> cebador inverso para Nfa-OPSS

15

<400> 118

**gtaagctttc aggcccagag ctggcctt  
28**

<210> 119  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> cebador directo para Mtb-T

25

<400> 119

**gtcatatgat gacacgatac gactcgctg  
29**

30

<210> 120  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> cebador inverso para Mtb-T

40

<400> 120

**gtaagctttc attccagagc ggtctcggc  
29**

<210> 121  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> cebador directo para Msm-T

50

<400> 121

**gtcatatgat gacgcgctac gactccctg  
29**

55

<210> 122  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial



ES 2 711 830 T3

<220>  
<223> cebador inverso para Msm-T

5 <400> 122

**ataagctttc attccagcgc gtcctcggc**  
**29**

10 <210> 123  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> cebador directo para pCL-P(CJ1)-Msm-T  
  
<400> 123

**gatatcgcag cagccatcat c**  
**21**

20 <210> 124  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> cebador inverso para pCL-P(CJ1)-Msm-T  
  
<400> 124

30 **ccaagcttt cattccagcgc cgtcctcg**  
**28**

## REIVINDICACIONES

1. Un método para producir cisteína, que comprende:

- 5 1) cultivar un microorganismo recombinante en que la actividad de fosfoserina fosfatasa SerB endógena está reducida, para producir O-fosfoserina (OPS); y  
2) hacer reaccionar la OPS de la etapa 1) con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o con un sulfuro en presencia de un microorganismo que expresa OPSS, para producir cisteína, en el que el nivel de actividad enzimática de SerB se reduce usando una técnica seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 10 eliminación del gen cromosómico que codifica la enzima SerB,  
la introducción de mutación en el gen cromosómico que codifica la enzima SerB para reducir la actividad génica endógena,  
15 la sustitución del gen cromosómico que codifica la enzima SerB con un gen mutado para reducir la actividad enzimática endógena,  
la introducción de mutación en una región reguladora para el gen que codifica la enzima SerB para reducir la actividad génica endógena, y  
la introducción de un oligonucleótido de antisentido complementario a un transcrito del gen que codifica la enzima SerB para inhibir la traducción del ARNm.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que la fosfoserina fosfatasa tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante en que se altera la actividad de SerB endógena se cultiva en un medio que contiene glicina o serina.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en el que el medio contiene glicina en una cantidad de 0,1 a 10 g/l.
5. El método de la reivindicación 3, en el que el medio contiene serina en una cantidad de 0,1 a 5 g/l.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante se modifica además para potenciar la actividad de fosfoglicerato deshidrogenasa SerA o fosfoserina aminotransferasa SerC.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la SerA es un tipo silvestre o un mutante resultante a inhibición por retroalimentación de serina.
- 35 8. El método de la reivindicación 6, en el que:
- i) la SerA tiene una seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 7; y  
40 ii) la SerC tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante se modifica además para reducir la actividad de un operón PhnCDE de phnC (componente de unión a ATP del transporte de fosfonato, EG 10713)-phnD (componente de proteína de unión periplásmica del transportador Pn, EG 10714)-phnE (componente de membrana integrado del transportador ABC de alquilfosfonato, EG 11283).
- 45 10. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante se modifica además para reducir la actividad de fosfatasa alcalina (PhoA) o fosfatasa ácida AphA.
- 50 11. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante se modifica además para potenciar la actividad de la nucleótido transhidrogenasa PntAB.
12. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante se modifica además para potenciar la actividad de al menos una enzima seleccionada entre el grupo que consiste en permeasa del flujo de o-acetilserina/cisteína YfiK, proteína de flujo de homoserina/homoserina lactona RhtB y proteína de flujo de treonina/homoserina RhtC.
- 55 13. El método de la reivindicación 6, 11 o 12, en el que el nivel de actividad enzimática se potencia usando una técnica seleccionado entre el grupo que consiste en aumentar un número de copias de un gen que codifica la enzima, introducción de una mutación en una región reguladora para el gen para potenciar la actividad enzimática, sustitución del gen cromosómico con un gen mutado para potenciar la actividad enzimática e introducción de una mutación en el gen cromosómico para potenciar la actividad enzimática.
- 60 14. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante se modifica además para reducir la actividad de al menos una seleccionada del grupo que consiste en las isoenzimas de fosfoglicerato mutasa GpmA,
- 65

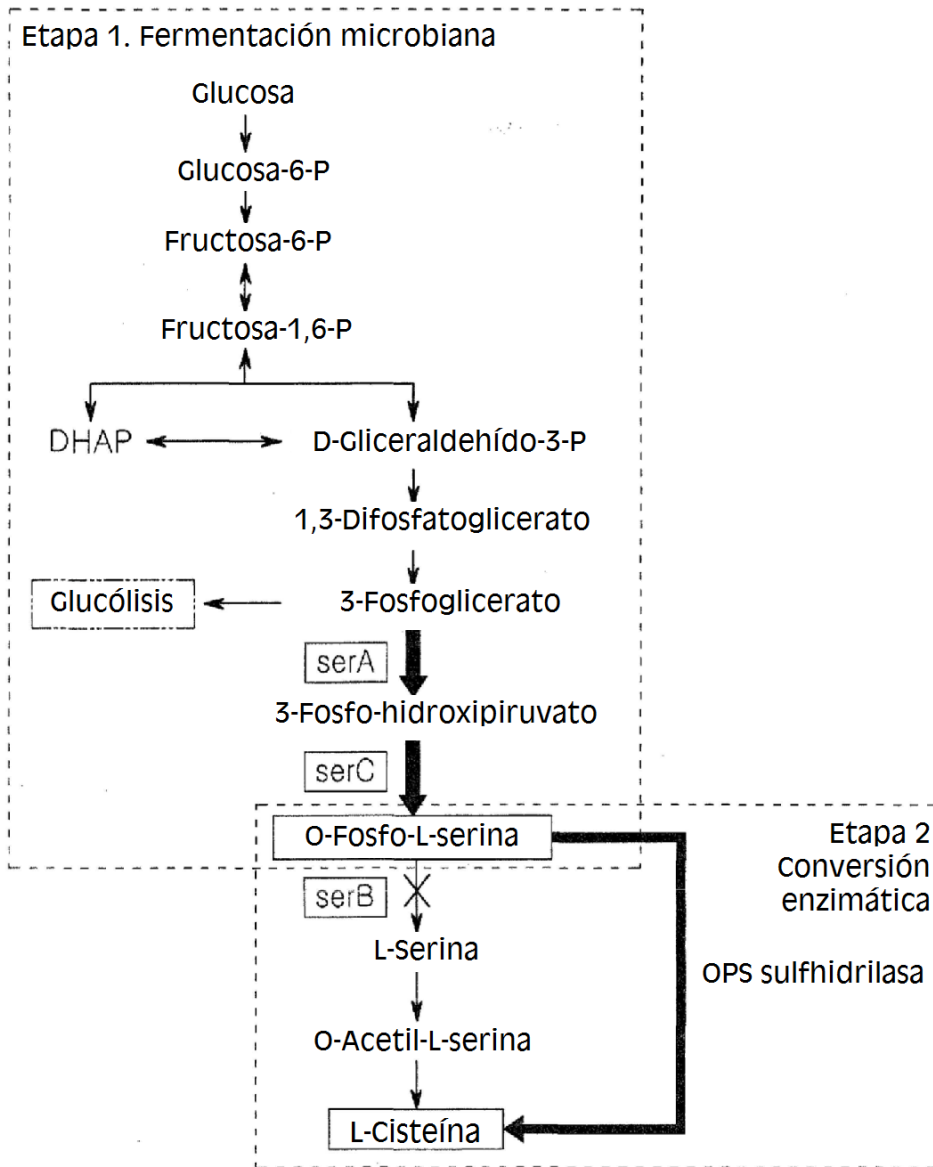
Gpml o GpmB.

- 5 15. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante se modifica además para reducir la actividad de La L-serina deshidratasa I SdaA.
16. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante se modifica además para reducir la actividad de 2-amino-3-cetobutirato coenzima A ligasa Kbl o un factor de transcripción IciR.
- 10 17. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante se modifica además para potenciar la actividad de al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en acetil-CoA sintetasa Acs, ácido acético cinasa AckA-fosfotransacetilasa Pta, malato sintasa G GlcB, malato deshidrogenasa MaeB, glutamato deshidrogenasa GdhA, glioxilato carboligasa Glc, tartronato semialdehído reductasa 2 GlxR y glicerato cinasa II GlxK.
- 15 18. El método de la reivindicación 17, en el que el microorganismo recombinante se mejora en el consumo de azúcar y el crecimiento por potenciación de la actividad de al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en Glc, GlxR y GlxK.
- 20 19. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo recombinante es *Escherichia sp.* o bacterias corineformes.
20. El método de la reivindicación 1, en el que el sulfuro de la etapa 2) se selecciona del grupo que consiste en Na<sub>2</sub>S, NaSH, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>S, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y una combinación de los mismos.
- 25 21. El método de la reivindicación 1, en el que el sulfuro de la etapa 2) se usa a una concentración molar de 0,1 a 3 veces tan alta como la de OPS usada en la reacción de la etapa 2).
- 30 22. El método de la reivindicación 1, en el que la OPSS de la etapa 2) es de al menos una especie seleccionada del grupo que consiste en *Aeropyrum pernix*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* y *Trichomonas vaginalis*.
23. El método de la reivindicación 22, en el que la OPSS se modifica además para aumentar una tasa de conversión de la etapa 2).
- 35 24. El método de la reivindicación 1, en el que la reacción de la etapa 2) se realiza en presencia de un cofactor seleccionado de PLP (piridoxal-5-fosfato) 0,001 ~ 2 mM, DTT (ditiotreitól) 0,001 ~ 100 mM y una combinación de los mismos.
- 40 25. El método de la reivindicación 1, que comprende además aislar y purificar la cisteína producida en la reacción de la etapa 2).
- 45 26. Un microorganismo recombinante en que la actividad de fosfoserina fosfatasa SerB endógena está reducida y que se modifica además para potenciar la actividad de fosfoglicerato deshidrogenasa SerA o fosfoserina aminotransferasa SerC, en el que la SerA es resistente a inhibición por retroalimentación de serina.
27. El microorganismo recombinante de la reivindicación 26, que se modifica además para reducir la actividad de al menos una seleccionada entre PhnCDE, PhoA y AphA.
- 50 28. El microorganismo recombinante de la reivindicación 26, que está depositado con el n.º de acceso KCCM11103P.
29. Un método para producir N-acetilcisteína o S-carboximetilcisteína, que comprende:
- 55 1) cultivar un microorganismo recombinante en que la actividad de fosfoserina fosfatasa SerB endógena está reducida, para producir O-fosfoserina (OPS);
- 2) hacer reaccionar la OPS de la etapa 1) con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o con un sulfuro en presencia de un microorganismo que expresa OPSS, para producir cisteína, y
- 3) sintetizar N-acetilcisteína o S-carboximetilcisteína. a partir de la cisteína producida en la etapa 2), en el que el nivel de actividad enzimática SerB se reduce usando una técnica seleccionada del grupo que consiste en:
- 60 eliminación del gen cromosómico que codifica la enzima SerB,
- la introducción de mutación en el gen cromosómico que codifica la enzima SerB para reducir la actividad génica endógena,
- la sustitución del gen cromosómico que codifica la enzima SerB con un gen mutado para reducir la actividad enzimática endógena,
- 65 la introducción de mutación en una región reguladora para el gen que codifica la enzima SerB para reducir la

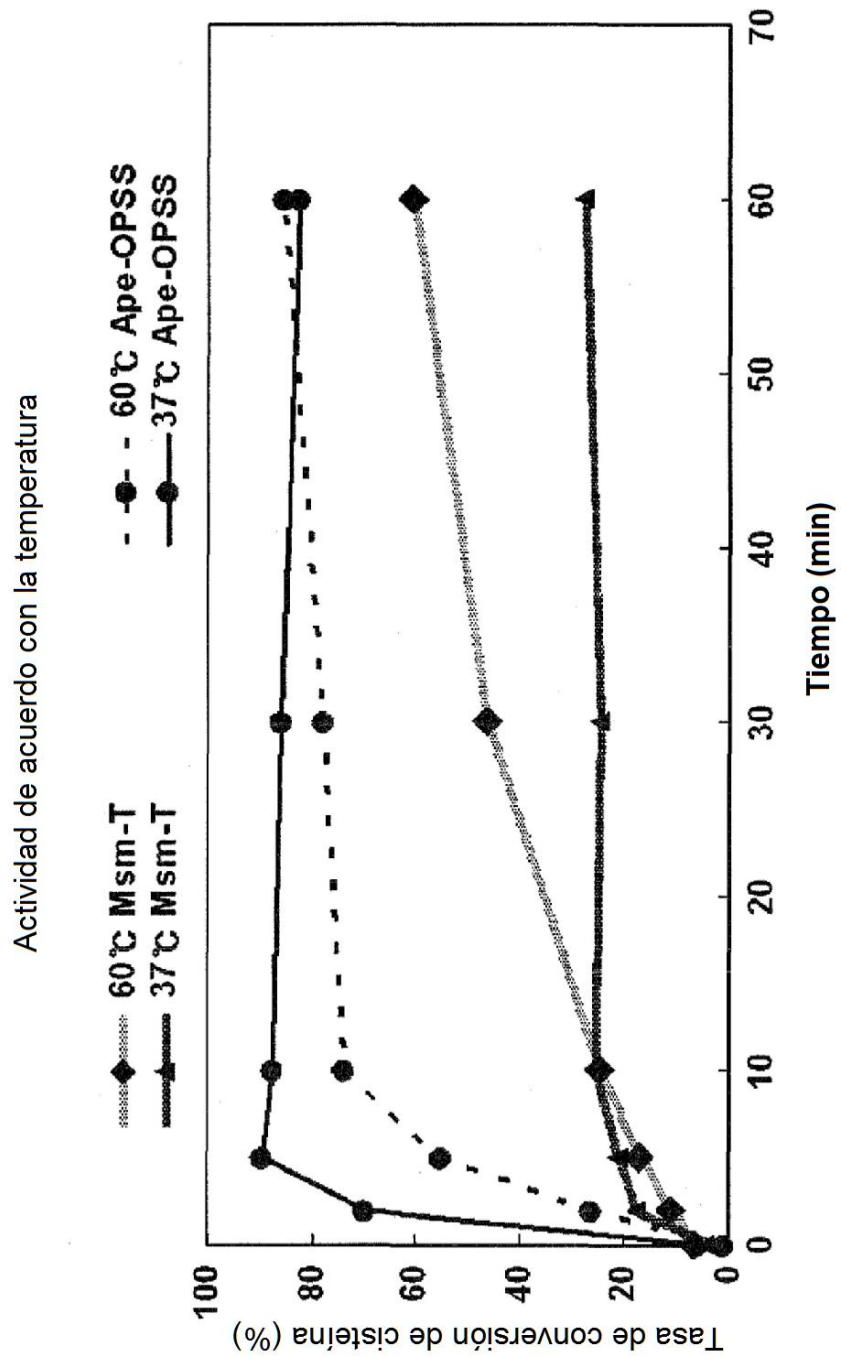
actividad génica endógena, y  
la introducción de un oligonucleótido de antisentido complementario a un transcrito del gen que codifica la enzima SerB para inhibir la traducción del ARNm.

- 5 30. El método de la reivindicación 29, que comprende además aislar y purificar dicha N-acetilcisteína o S-carboximetilcisteína producida en la reacción de la etapa 3).

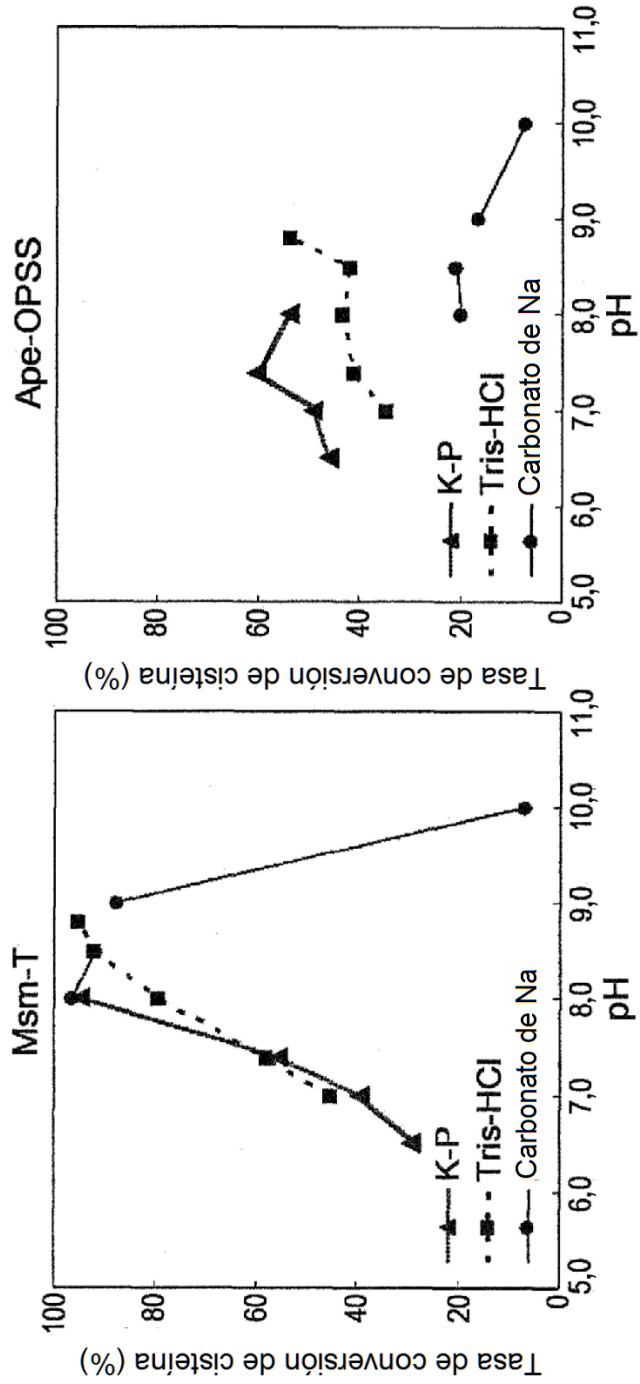
【 Figura 1 】



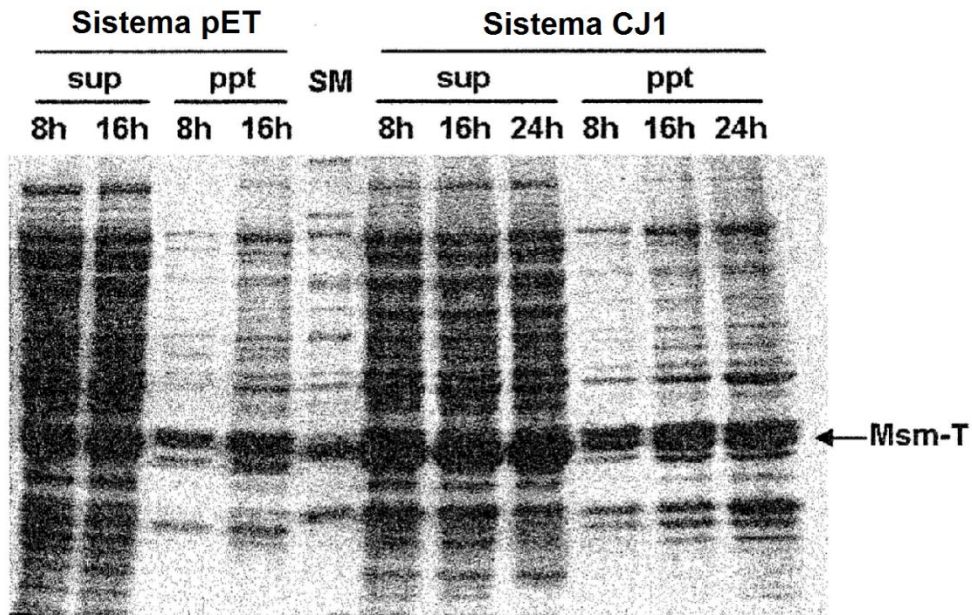
【 Figura 2 】



【Figura 3】

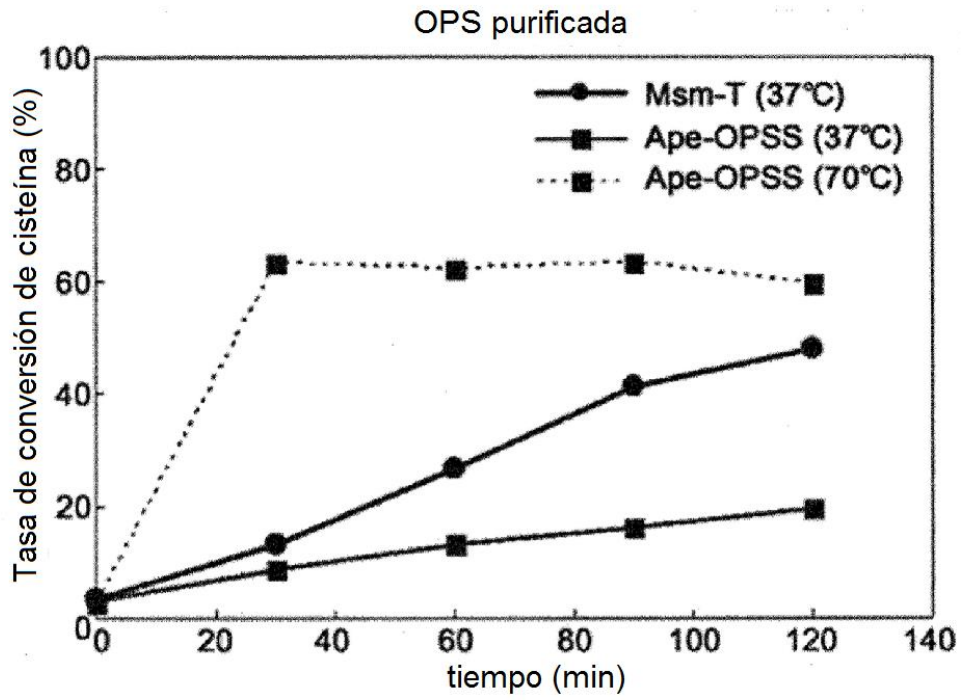


【 Figura 4 】





【 Figura 5 】



【 Figura 6 】

