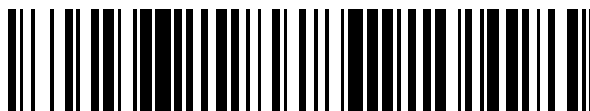


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 098**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C07K 14/195** (2006.01)

**C12N 15/31** (2006.01)

**C12P 13/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2014 PCT/KR2014/004161**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14182125**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2014 E 14795225 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2994526**

54 Título: **Proteína de exportación de O-fosfoferina novedosa y procedimiento para producir O-fosfoferina usando la misma**

30 Prioridad:

**10.05.2013 KR 20130053438**

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

**10.01.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIM, HYE WON;  
KIM, SOL;  
CHANG, JIN SOOK y  
YOO, IN HWA**

74 Agente/Representante:

**PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén**

ES 2 737 098 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

Proteína de exportación de O-fosfofoserina novedosa y procedimiento para producir O-fosfofoserina usando la misma

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un polipéptido aislado novedoso que tiene la capacidad de exportar O-fosfofoserina (a continuación en el presente documento descrita como "OPS") que es un precursor de L-cisteína, un polinucleótido que codifica el polipéptido, un vector que comprende el polinucleótido, un microorganismo que produce OPS que tiene una actividad potenciada del polipéptido, un procedimiento para producir OPS usando el microorganismo, y un procedimiento para preparar cisteína o sus derivados, que comprende hacer reaccionar OPS producida mediante el procedimiento que produce OPS anterior con un sulfuro en presencia de O-fosfofoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un  
10 microorganismo que expresa OPSS.

### Técnica anterior

15 La L-cisteína, un aminoácido que desempeña un papel importante en el metabolismo del azufre en todos los organismos vivos, se usa no solo en la síntesis de proteínas biológicas tales como queratina del pelo, glutatona, biotina, metionina, y otros metabolitos que contienen azufre, sino también como un precursor para la biosíntesis de coenzima A.

Los procedimientos conocidos para producir L-cisteína usando microorganismos incluyen un procedimiento para convertir biológicamente D,L-ATC en L-cisteína usando microorganismos (Ryu OH *et al.*, Process Biochem., 32:201-209, 1997). Otro procedimiento conocido es un procedimiento para producir L-cisteína mediante fermentación directa usando *E. coli* (EP 0885962B; Wada M y Takagi H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006). Mientras tanto, los  
20 autores de la presente invención realizaron estudios para desarrollar un procedimiento nuevo para producir L-cisteína, y como resultado, encontraron una enzima (O-fosfofoserina sulfhidrilasa (OPSS)) que sintetiza L-cisteína a partir de O-fosfofoserina (OPS) en determinados microorganismos. Basándose en este hallazgo, los autores de la presente invención desarrollaron un procedimiento para producir cisteína haciendo reaccionar OPS con la enzima OPSS cultivando un microorganismo mutado para acumular OPS (Publicación de Patente Coreana N.º 10-2012-004111). Todavía existen las necesidades de producir OPS en cantidades excesivas para producir cisteína con un  
25 alto rendimiento. En consecuencia, los autores de la presente invención han hecho grandes esfuerzos para descubrir un exportador apropiado que permita que la O-fosfofoserina producida en una cepa que produce OPS se libere de las células sin problemas. Además, basándose en diversos tipos de transportadores conocidos, los autores de la presente invención seleccionaron ydeD que codifica la proteína de bomba de eflujo de O-acetilserina/cisteína, yfiK que codifica la permeasa de eflujo de O-acetilserina/cisteína (Franke I, Resch A, Dassler T, Maier T y Bock A, J. Bacteriology, 185: 1161-166, 2003), rhtB que codifica la proteína de bomba de eflujo homoserina/homoserina lactona (Zakataeva NP, Aleshin VV, Tokmakova IL, Troshin PV, Livshits VA FEBS Lett 1999;452(3);228-32) y similares, y en particular encontraron que la potenciación de RhtB en la cepa que produce OPS da como resultado un incremento  
30 en la concentración de OPS (Publicación de Patente Coreana N.º 10-2012-0041115). Sin embargo, para la producción de mayor rendimiento de cisteína, todavía se requiere el desarrollo de un transportador que tenga una mayor capacidad de exportar OPS.

### Divulgación de la invención

#### Problema técnico

40 Los autores de la presente invención han hecho grandes esfuerzos para descubrir proteínas que tienen actividad exportadora de OPS para poder incrementar adicionalmente la producción de OPS, y como resultado, han identificado dos polipéptidos novedosos que tienen excelente actividad exportadora de OPS y han encontrado que los polipéptidos pueden exportar OPS de una cepa que produce OPS más eficazmente, completando de este modo la presente invención.

#### Solución al problema

45 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir O-fosfofoserina (OPS), que comprende cultivar un microorganismo que produce O-fosfofoserina que tiene una actividad potenciada de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 y tiene una actividad exportadora de OPS.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un polipéptido aislado novedoso que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2, que tiene una actividad exportadora de O-fosfofoserina.

50 Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un polinucleótido que codifica el polipéptido y un vector que comprende el polinucleótido.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo que produce O-fosfofoserina que tiene una actividad potenciada de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 y tiene una actividad exportadora de O-fosfofoserina (OPS).

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir cisteína o sus derivados, que comprende hacer reaccionar O-fosfoserina, producida mediante el procedimiento descrito anteriormente para producir O-fosfoserina, con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS.

## 5 Efectos ventajosos de la invención

El polipéptido novedoso según la invención que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 tiene excelente actividad exportadora de OPS, y por tanto cuando el polipéptido se aplica a un microorganismo que produce O-fosfoserina, se puede producir O-fosfoserina con alta eficacia en el microorganismo.

## Breve descripción de los dibujos

10 La FIG. 1 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la medición de OPS intracelular mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) después de eliminar completamente OPS liberada de un cultivo del microorganismo recombinante según la invención que tiene actividades de proteínas YggT y MacB potenciadas.

15 La FIG. 2 es un diagrama esquemático que muestra un procedimiento para producir L-cisteína mediante la acumulación de O-fosfoserina de la biosíntesis y fermentación microbiana de O-fosfoserina y que convierte enzimáticamente la O-fosfoserina acumulada en L-cisteína.

## Mejor modo de llevar a cabo la invención

20 Un aspecto de la presente invención incluye un procedimiento para producir O-fosfoserina (OPS), que comprende cultivar un microorganismo que produce O-fosfoserina que tiene una actividad potenciada de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 y que tiene una actividad exportadora de O-fosfoserina (OPS).

25 Específicamente, el procedimiento de acuerdo con el aspecto anterior de la presente invención puede comprender las etapas de: a) producir OPS cultivando un microorganismo que produce OPS que tiene una actividad potenciada de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 y tiene una actividad exportadora de OPS; y b) aislar OPS del cultivo del microorganismo, pero no se limita a esto.

La etapa a) del procedimiento de la presente invención es una etapa de cultivar un microorganismo que produce OPS que tiene una actividad potenciada de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 y tiene una actividad exportadora de OPS.

30 Como se usa en el presente documento, el término "O-fosfoserina (a continuación en el presente documento descrita como "OPS")" se refiere a un éster de serina y ácido fosfórico que es un componente de muchas proteínas. La OPS es un precursor de L-cisteína y se puede convertir en cisteína por reacción con un sulfuro bajo la acción catalítica de OPS sulfhidrilasa (a continuación en el presente documento descrita como "OPSS"). En consecuencia, es un factor importante para incrementar la productividad de OPS en la producción de cisteína, y por tanto se ha requerido para desarrollar transportadores que permitan que la OPS intracelular se secrete eficazmente de las cepas que producen OPS.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido que tiene una actividad exportadora de O-fosfoserina (OPS)" se refiere a una proteína de membrana que tiene una actividad exportadora de OPS. Específicamente, el polipéptido es una proteína de membrana de *E. coli*. Los autores de la presente invención han identificado dos proteínas de membrana de *E. coli* que son proteínas de membrana novedosas que pueden exportar OPS de las células y derivadas de *E. coli* que pueden crecer bajo la condición de que esté presente una cantidad excesiva de OPS. Específicamente, las proteínas de membrana de *E. coli* novedosas que tienen capacidad exportadora de OPS se identifican como YggT que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, que es una proteína de membrana interna predicha, y como MacB (sistema de transporte de exportación de macrólido MacAB-ToIC - subunidad de membrana) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. Se sabe que la proteína YggT de SEQ ID NO:1 actúa como una proteína de membrana interna de *E. coli* y la proteína MacB de SEQ ID NO:2 funciona como un transportador de macrólidos, pero la actividad exportadora de OPS de las proteínas no se conocía antes de la presente invención y se identificó por primera vez por los autores de la presente invención. Además, el alcance del polipéptido de la presente invención engloba, no solo el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2, sino también una proteína de membrana que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos un 70 %, específicamente al menos un 80 %, más específicamente al menos un 90 %, incluso más específicamente al menos un 95 %, incluso más específicamente al menos un 98 %, y lo más específicamente al menos un 99 %, con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2, y tiene una actividad exportadora de OPS que es sustancialmente idéntica o comparable a la del polipéptido de SEQ ID NO:1 o 2. Además, es obvio que una variante de polipéptido que comprende una delección, modificación, sustitución o adición en uno o más residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 se encuentra dentro del alcance de la presente invención, siempre que tenga la homología descrita anteriormente y tenga sustancialmente actividad exportadora de OPS.

Como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos restos de polinucleótido o polipéptido. La correspondencia entre las secuencias de una forma a otra se puede determinar mediante técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar la homología mediante una comparación directa de la información de la secuencia entre dos moléculas de polipéptido alineando la información de la secuencia y usando programas de ordenador fácilmente disponibles. De forma alternativa, la homología se puede determinar mediante hibridación de polinucleótidos bajo condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa específica de cadena sencilla y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

Como se usa en el presente documento, el término "homólogo" en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas se refiere a la relación entre proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluidas las proteínas de superfamilias y las proteínas homólogas de diferentes especies. Dichas proteínas (y sus genes codificantes) presentan homología de secuencia, como se refleja en su alto grado de similitud de secuencia. Sin embargo, en el uso común y en la presente invención, el término "homólogo", cuando se modifica con un adjetivo tal como "muy alto", se puede referir a una similitud de secuencia y no a un origen evolutivo común.

Como se usa en el presente documento, el término "similitud de secuencia" se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias ácido nucleico o de aminoácidos de proteínas que pueden o no compartir un origen evolutivo común. En un modo de realización, dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente un 21 % (específicamente al menos aproximadamente un 50 %, y lo más específicamente al menos aproximadamente un 75 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 % o un 99 %) del polipéptido coinciden a lo largo de la longitud definida de las secuencias de aminoácidos. Las secuencias que son sustancialmente homólogas se pueden identificar comparando las secuencias usando programas informáticos estándar disponibles en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo, condiciones rigurosas como se define para ese particular sistema. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro del conocimiento de la técnica (véase, p. ej., Sambrook *et al.*, 1989, *infra*).

En un ejemplo de la presente invención, se mostró que una cepa con una actividad potenciada del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o una actividad potenciada del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 tiene excelente actividad secretora de OPS en comparación con una cepa que tiene rhtB, emrD o ycaD potenciado, que es un grupo comparativo (ejemplo 3).

Como se describe anteriormente, el polipéptido de la presente invención tiene una excelente actividad exportadora de OPS, y por tanto cuando se cultiva un microorganismo que tiene una actividad potenciada del polipéptido, se puede producir eficazmente OPS.

Un procedimiento para potenciar la actividad del polipéptido no está específicamente limitado, siempre que pueda potenciar la actividad del polipéptido. Los ejemplos de este procedimiento incluyen un procedimiento para incrementar el número de copias intracelulares de un gen que codifica el polipéptido, un procedimiento para introducir una mutación en una secuencia reguladora de expresión para el gen cromosómico que codifica el polipéptido, un procedimiento para reemplazar una secuencia reguladora de expresión para el gen cromosómico que codifica el polipéptido con una secuencia que tiene una fuerte actividad, un procedimiento para sustituir el gen cromosómico que codifica el polipéptido con un gen mutado para incrementar la actividad del polipéptido, y un procedimiento para introducir una mutación en el gen cromosómico que codifica el polipéptido para potenciar la actividad del polipéptido. El procedimiento para potenciar la actividad del polipéptido se puede aplicar igualmente para potenciar las actividades de otros polipéptidos. En un ejemplo de la presente invención, que muestra un procedimiento típico que puede potenciar la actividad del polipéptido, la actividad del polipéptido según la invención que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 se potenció introduciendo un vector, que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido, en un microorganismo que produce OPS.

Como se usa en el presente documento, el término "introducción" se refiere a un procedimiento de transferir un vector, que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido, a una célula huésped. Esta introducción se puede realizar fácilmente usando cualquier procedimiento convencional conocido en la técnica. En general, los ejemplos del procedimiento de introducción incluyen precipitación por CaCl<sub>2</sub>, el procedimiento Hanahan que es un procedimiento de CaCl<sub>2</sub> mejorado que usa DMSO (dimetil sulfóxido) como material reductor para incrementar la eficacia, electroporación, precipitación por fosfato cálcico, fusión de protoplasto, agitación usando fibra de carburo de silicio, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por PEG, transformación mediada por sulfato de dextrano, transformación mediada por lipofectamina, y transformación mediada por desecación/inhibición. El procedimiento para transformar un vector que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención no está limitado a los ejemplos descritos anteriormente, y cualquier procedimiento de transformación o transfección convencionales conocidos en la técnica se puede usar sin limitación.

Como se usa en el presente documento, el término "microorganismo que produce OPS" se refiere a una cepa microbiana procarionta o eucariota que puede producir OPS en su interior, específicamente un microorganismo que puede acumular OPS en su interior mediante ingeniería genética. Para el propósito de la presente invención, el microorganismo puede ser cualquier microorganismo procarionta o eucariota que tiene una actividad potenciada del

polipéptido de SEQ ID NO:1 o 2, y por tanto puede producir OPS. Los ejemplos del microorganismo incluyen cepas microbianas que pertenecen al género *Escherichia*, al género *Erwinia*, al género *Serratia*, al género *Providencia*, al género *Corynebacterium* y al género *Brevibacterium*. Específicamente, el microorganismo puede ser un microorganismo del género *Escherichia*. más específicamente, puede ser *E. coli*. En particular, un microorganismo del género *Escherichia* o *Corynebacterium* puede producir OPS y L-serina, porque contiene proteínas SerA, SerC y SerB que son enzimas en la ruta de biosíntesis de L-serina (Ahmed Zahoor, Computational and structural biotechnology journal, vol 3, octubre de 2012;Wendisch VF et al., Curr Opin Microbiol. junio de 2006;9(3):268-74; Peters-Wendisch P et al., Appl Environ Microbiol. noviembre de 2005;71(11):7139-44). En un ejemplo de la presente invención, se usó *E. coli* como ejemplo representativo del microorganismo que produce OPS.

Además, el microorganismo que produce OPS puede ser además un microorganismos modificado para reducir la actividad de fosfoserina fosfatasa endógena (a continuación en el presente documento descrita como "SerB").

La SerB tiene una actividad de que convierte OPS en L-serina, y por tanto el microorganismo modificado para reducir la actividad de SerB tiene la propiedad de acumular OPS en el mismo, lo que sugiere que es útil para la producción de OPS. La reducción en la actividad de SerB significa que la actividad de SerB se reduce o se elimina en comparación con la de una cepa no mutada. La reducción en la actividad de SerB se puede lograr usando diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos del procedimiento para reducir la actividad de la enzima SerB incluyen, pero no se limitan a, un procedimiento para sustituir el gen cromosómico que codifica la enzima con un gen mutado para reducir o eliminar la actividad de la enzima, un procedimiento para introducir una mutación en una secuencia reguladora de expresión para el gen cromosómico que codifica la enzima, un procedimiento para reemplazar una secuencia reguladora de expresión para el gen cromosómico que codifica la enzima con un gen que tiene una actividad débil, delecionar el gen cromosómico que codifica la enzima, un procedimiento para introducir un oligonucleótido antisentido que se une complementariamente al transcrito del gen cromosómico para inhibir la traducción del ARNm en la proteína, un procedimiento de añadir artificialmente una secuencia complementaria a la secuencia SD del gen que codifica la enzima en la parte anterior de la secuencia SD para formar una estructura secundaria que hace que la adhesión del ribosoma sea imposible, y un procedimiento de ingeniería de transcripción inversa (RTE) de añadir un promotor al extremo 3' del marco de lectura abierto (ORF) de la secuencia correspondiente para que se transcriba de manera inversa. En un ejemplo de la presente invención, un vector que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido según la invención de SEQ ID NO:1 o 2 se introdujo en el microorganismo, CA07-0012 (número de acceso: KCCM11121P) divulgado en la Publicación de Patente Coreana N.º 10-2012-004115 y la Publicación de Patente de EE. UU. abierta a consulta N.º 2012-0190081, como un microorganismo mutado para reducir la actividad de SerB endógena.

Además, el microorganismo que produce OPS puede ser un microorganismo que tiene una actividad potenciada de fosfoglicerato deshidrogenasa (a continuación en el presente documento descrita como "SerA") o fosfoserina aminotransferasa (a continuación en el presente documento descrita como "SerC").

La SerA es una proteína que tiene una actividad de convertir 3-fosfoglicerato en 3-fosfohidroxipiruvato, y la SerA puede ser una proteína natural o una variante resistente a la retroinhibición de serina. La SerC también es una proteína que tiene una actividad de convertir 3-fosfoglicerato en O-fosfoserina. Por tanto, el microorganismo con actividad potenciada de SerA y/o SerC puede ser útil como cepa que produce OPS. En un ejemplo de la presente invención, se usa CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC (número de acceso: KCCM11103P), que es un microorganismo que tiene una actividad potenciada de SerA (resistente a la retroinhibición de serina) y SerC como se divulga en la Publicación de Patente Coreana N.º 10-2012-004115, como el microorganismo que produce OPS, se introdujo un vector de expresión que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:1 o 2 en el microorganismo para producir OPS. También, CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-yggT, que es una cepa representativa que tiene una actividad potenciada de yggT de SEQ ID NO:1, es una cepa microbiana que tiene actividades potenciadas de SerC y SerA resistente a la retroinhibición de serina y tiene el gen de la proteína yggT de SEQ ID NO:1 introducido en la misma. Esta CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-yggT se denominó "*Escherichia coli* CA07-0228" y se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, reconocido como una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest, a 7 de marzo de 2013 con el número de acceso KCCM11399P. Además, CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-macB, que es una cepa representativa que tiene una actividad potenciada de MacB de SEQ ID NO:2, es una cepa microbiana que tiene actividades potenciadas de SerC y SerA resistente a la retroinhibición de serina y tiene el gen de la proteína MacB de SEQ ID NO:2 introducido en la misma. Esta CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-macB se denominó "*Escherichia coli* CA07-0229" y se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, reconocido como una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest, a 7 de marzo de 2013 con el número de acceso KCCM11400P (ejemplo 2).

Además, el microorganismo puede tener además una capacidad reducida para realizar la captación o degradación intracelular de OPS. Específicamente, el microorganismo puede ser un microorganismo mutado para reducir la actividad de transportador ABC de alquilfosfonato PhnC/PhnD/PhnE (operón PhnCDE, es decir, componente que une ATP del transporte de fosfonato (PhnC; EG 10713)-componente de proteína de unión periplásmica de transportador Pn (PhnD; EG 10714)-componente de membrana integral del transportador ABC de alquilfosfonato (PhnE; EG 11283)), fosfatasa alcalina (PhoA) o fosfatasa ácida (AphA).

Además, el microorganismo de la presente invención puede tener además actividad potenciada de pirimidina nucleótido transhidrogenasa (PntAB; EC 1.6.1.1). Como se describe previamente en 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 redox intracelular.

5 Como se usa en el presente documento, el término "cultivar" significa hacer crecer el microorganismo bajo condiciones controladas artificialmente. Un procedimiento de cultivo en la presente invención se puede realizar usando un medio y condiciones de cultivo adecuados bien conocidos en la técnica. Cualquier experto en la técnica puede controlar fácilmente el procedimiento de cultivo dependiendo del tipo de cepa seleccionada. Específicamente, el cultivo puede ser un cultivo de tipo discontinuo, cultivo continuo o cultivo discontinuo alimentado, pero no se limita a estos.

10 En el cultivo del microorganismo recombinante que tiene una actividad reducida de SerB endógena, el medio debería contener adicionalmente glicina o serina, porque se induce la auxotrofia de serina del microorganismo recombinante. La glicina se puede proporcionar en forma de glicina purificada, un extracto de levadura que contiene glicina o triptona. La concentración de glicina en el medio es en general de 0,1-10 g/l, y específicamente de 0,5-3 g/l. Además, la serina se puede proporcionar en forma de serina purificada, un extracto de levadura que contiene serina o triptona. La concentración de serina en el medio es en general de 0,1-5 g/l, y específicamente de 0,1-1 g/l.

15 Además, el medio contiene una fuente de carbono. Los 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 se pueden usar solas o en combinación en el medio. Los ejemplos de una fuente de nitrógeno que puede estar contenida en el medio incluyen fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de maíz, soja y proteína de trigo, y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar solas o en combinación. Los ejemplos de una fuente de fósforo que puede estar contenida en el medio incluyen dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato de potasio y sales de sodio correspondientes. Además, el medio puede contener sales metálicas tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Adicionalmente, el medio también puede contener aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados. Estas fuentes o precursores se pueden añadir al medio de manera discontinua o continua.

20 Los compuestos tales como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico se pueden añadir al medio de manera adecuada durante el cultivo para ajustar el pH del medio de cultivo. Además, durante el cultivo, se puede usar un agente antiespumante tal como poliglicol éster de ácido graso para suprimir la formación de espuma. Además, para mantener el medio de cultivo en un estado aeróbico, se puede inyectar oxígeno o gas que contiene oxígeno en el medio de cultivo. Para una condición anaeróbica o microaeróbica, se puede proporcionar nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono sin aireación. El medio de cultivo se mantiene típicamente a una temperatura que oscila entre 27 °C y 37 °C, y específicamente entre 30 °C y 35 °C. En cuanto al período de cultivo, el cultivo se puede continuar hasta que se produzcan las cantidades deseadas de sustancias útiles. Específicamente, el período de cultivo es de 10-100 horas.

La etapa b) del procedimiento de la presente invención es una etapa de aislamiento de la OPS producida.

30 En la presente invención, la OPS producida en la etapa de cultivo además se puede aislar y purificar. Por ejemplo, la OPS deseada se puede recoger del cultivo usando un procedimiento adecuado conocido en la técnica que depende de un procedimiento de cultivo, por ejemplo, un procedimiento de cultivo de tipo discontinuo, de cultivo continuo o de cultivo discontinuo alimentado.

45 En un ejemplo de la presente invención, se identificó un polipéptido novedoso que tiene una actividad exportadora de OPS, que se define mediante la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 (ejemplo 1). También se examinó la productividad de OPS típicamente en CA07-0012, que es una cepa que produce OPS que tiene una actividad reducida de SerB junto con proteína RhtB, que se sabe que tiene actividad exportadora de OPS, la proteína de membrana de *E. coli* EmrD que pertenece a la superfamilia del facilitador principal (MFS) a la que pertenece MacB de la presente invención, y transportador de MFS YcaD. Como resultado, se mostró que, en comparación con la CA07-0012 control que muestra una productividad de OPS de 1,1 g/l, una cepa que produce OPS que expresa el polipéptido según la invención definido mediante SEQ ID NO:1 muestra una productividad de OPS de 1,6 g/l, y una cepa que produce OPS que expresa el polipéptido según la invención definido mediante SEQ ID NO:2 muestra una productividad de OPS de 1,5 g/l. Una cepa que produce OPS como un grupo comparativo que expresa RhtB también muestra una productividad de OPS de 1,3 g/l, que era más baja que la de la cepa que produce OPS que expresa el péptido según la invención, y cepas que producen OPS que expresan EmrD y YacD muestran productividades de OPS de 1,2 g/l y 0,9 g/l, respectivamente, que eran iguales a o más bajas que las del grupo control (tabla 3 y ejemplo 3). Además, los resultados anteriores se verificaron usando la cepa que produce OPS CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC que tiene actividades potenciadas de SerA y SerC que están implicadas en la ruta de biosíntesis de OPS, y como resultado, se confirmó que la cepa que produce OPS que expresa el polipéptido de la presente invención muestra una alta productividad de OPS en comparación con las del

grupo control y el grupo comparativo que expresa EmrD o YcaD (tabla 4 y ejemplo 3). Además, en la presente invención, para confirmar si el polipéptido de la presente invención muestra una función de exportación de OPS, se eliminó la OPS exportada del medio en el que se cultivó una cepa que tiene actividades potenciadas de proteínas YggT y MacB, después de que se midiera la concentración de OPS intracelular. Como resultado, se mostró que la cepa que tiene actividades potenciadas de YggT y MacB muestra una disminución en la concentración de OPS de aproximadamente un 30 % en comparación con el grupo control, lo que sugiere que el polipéptido de la presente invención funciona como una función de exportación de OPS (FIG. 1 y ejemplo 4).

Otro aspecto de la presente invención también incluye un polipéptido aislado que tiene una actividad exportadora de O-fosfoserina (OPS), que se define mediante la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, un polinucleótido que codifica el polipéptido, y un vector que comprende el polinucleótido.

En el presente documento, la O-fosfoserina y el polipéptido se describen anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero de unidades de nucleótidos unidos entre sí por un enlace covalente para formar una cadena. En general significa una hebra de ADN o ARN de cualquier longitud.

Un polinucleótido que codifica el polipéptido según la invención que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 puede ser específicamente un polinucleótido que tiene una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:3, pero no se limita a esto. Además, el alcance del polipéptido de la presente invención puede englobar, no solo el polinucleótido que tiene la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:3, sino también un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una similitud de al menos un 70 %, específicamente al menos un 80 %, más específicamente al menos un 90 %, incluso más específicamente al menos un 90 %, incluso más específicamente al menos un 95 %, y lo más específicamente al menos un 98 %, con la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:3, y puede codificar un polipéptido que tiene sustancialmente una actividad exportadora de OPS. Además, es obvio que una variante que tiene una secuencia de polinucleótidos que comprende una delección, modificación, sustitución o adición en al menos un residuo de aminoácido también cae dentro del alcance de la presente invención.

Además, un polinucleótido que codifica el polipéptido según la invención que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 puede ser específicamente un polinucleótido que tiene una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:4, pero no se limita a esto. Además, el alcance de la presente invención puede englobar, no solo el polinucleótido que tiene la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:4, sino también un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una similitud de al menos un 70 %, específicamente al menos un 80 %, más específicamente al menos un 90 %, incluso más específicamente al menos un 90 %, incluso más específicamente al menos un 95 %, y lo más específicamente al menos un 98 %, con la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:4, y puede codificar un polipéptido que tiene sustancialmente una actividad exportadora de OPS. Además, es obvio que una variante que tiene un polinucleótido que comprende una delección, modificación, sustitución o adición en al menos un residuo de aminoácido también cae dentro del alcance de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a cualquier vehículo para el clonado de y/o transferencia de un ácido nucleico a una célula huésped. Un vector puede ser un replicón al que se puede unir otro segmento de ADN para causar la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (p. ej., plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, que se puede replicar bajo su propio control. El término "vector" puede incluir vehículos tanto víricos como no víricos para introducir el ácido nucleico en una célula huésped *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. El término "vector" también puede incluir ADN de minicírculo. Por ejemplo, el vector puede ser un plásmido sin secuencias de ADN bacteriano. La eliminación de secuencias de ADN bacteriano que son ricas en regiones CpG se ha mostrado que disminuye el silenciamiento de expresión transgénica y da como resultado una expresión más persistente de vectores de ADN plasmídico (p. ej., Ehrhardt, A. *et al.* (2003) *HumGene Ther* 10: 215-25; Yet, N. S. (2002) *Mol Ther* 5: 731-38; Chen, Z. Y. *et al.* (2004) *Gene Ther* 11 : 856-64). El término "vector" también puede incluir transposones (*Annu Rev Genet.* 2003;37:3-29), o cromosomas artificiales. Específicamente, el vector que se usa en la presente invención puede ser un vector pACYC177, pACYC184, pCL1920, pECCG117, pUC19, pBR322 o pMW118. En un ejemplo de la presente invención, se usó un vector pCL1920.

Otro aspecto de la presente invención también incluye un microorganismo que produce O-fosfoserina que tiene una actividad potenciada de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 y que tiene una actividad exportadora de O-fosfoserina.

En el presente documento, la O-fosfoserina, el polipéptido y el microorganismo que produce O-fosfoserina son como se describe anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención también incluye un procedimiento para producir cisteína o sus derivados, el procedimiento que comprende hacer reaccionar O-fosfoserina, producida mediante el procedimiento descrito anteriormente para producir O-fosfoserina, con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS.

Específicamente, el procedimiento para producir cisteína o sus derivados comprende las etapas de: a) producir OPS cultivando un microorganismo que produce OPS que tiene una actividad potenciada de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 y tiene una actividad exportadora de OPS; y b) hacer reaccionar la OPS, producida en la etapa a), con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS.

Como se usa en el presente documento, el término "O-fosfoserina sulfhidrilasa (descrita como "OPSS")" se refiere a una enzima que cataliza una reacción en la que se proporciona un grupo tiol (SH) a OPS para convertir OPS en cisteína. La enzima se encontró por primera vez en *Aeropyrum pernix*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatics* 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). Además, el alcance de OPSS incluye no solo la proteína OPSS natural, sino también una variante que comprende una delección, sustitución o adición en uno o más nucleótidos de una secuencia de polinucleótidos que codifica la OPSS y muestra una actividad que es igual a o más alta que la actividad biológica de la proteína OPSS natural. Además, el alcance de OPSS incluye la proteína OPSS divulgada en la Publicación de Patente Coreana N.º 10-2012-0041115 y Registro de Patente Coreana N.º 10-1208267, y sus variantes.

El sulfuro que se usa en la presente invención puede ser cualquier sulfuro que se puede proporcionar no solo en forma sólida que se usa en general en la técnica, sino también en forma líquida o gaseosa debido a la diferencia de pH, presión y/o solubilidad, y se puede convertir en un grupo tiol (SH) en forma de, por ejemplo, sulfuro ( $S^{2-}$ ) o tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ). Específicamente, el sulfuro que se usa en la presente invención puede ser  $Na_2S$ , NaSH,  $H_2S$ ,  $(NH_4)_2S$ , NaSH o  $Na_2S_2O_3$ , que puede proporcionar un grupo tiol a OPS. En la reacción, se suministra un único grupo tiol a un único grupo OPS reactivo para producir una única cisteína o un derivado de la misma. En esta reacción, se añade un sulfuro específicamente en una cantidad de 0,1-3 moles, y específicamente de 1-2 moles por mol de OPS. Lo más específicamente, se usan OPS y un sulfuro que proporciona un grupo tiol en una proporción molar de 1:1 para economizar.

Además, el procedimiento de la presente invención comprende además una etapa de aislamiento y purificación de la cisteína producida mediante la reacción de la etapa b). En el presente documento, la cisteína deseada se puede recoger aislándola y purificándola de la solución de reacción usando una reacción adecuada conocida en la técnica.

Además, la cisteína producida mediante el procedimiento de la presente invención se puede sintetizar fácilmente en un derivado de cisteína mediante una reacción de síntesis química conocida en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "derivados" se refiere a compuestos similares obtenidos modificando químicamente una porción de cualquier compuesto. Normalmente, el término significa compuestos en los que un átomo de hidrógeno o un grupo de átomos se sustituye con otro átomo de hidrógeno o grupo de átomos.

Como se usa en el presente documento, el término "derivados de cisteína" se refiere a compuestos en los que un átomo de hidrógeno o grupo de átomos en la cisteína se sustituye con otro átomo o grupo de átomos. Por ejemplo, los derivados de cisteína pueden tener una forma en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino ( $-NH_2$ ) o el átomo de azufre del grupo tiol ( $-SH$ ) en la cisteína tenga otro átomo o grupo de átomos unido a él. Los ejemplos de derivados de cisteína incluyen, pero no se limitan a, NAC (N-acetilcisteína), SCMC (S-carboximetilcisteína), BOC-CYS(ME)-OH, (R)-S-(2-amino-2-carboxietil)-L-homocisteína, ácido (R)-2-amino-3-sulfopropiónico, ácido D-2-amino-4-(etiltio)butírico, 3-sulfino-L-alanina, Fmoc-cis(Boc-metil)-OH, seleno-L-cistina, S-(2-tiazolil)-L-cisteína, S-(2-tienil)-L-cisteína, S-(4-tolil)-L-cisteína, etc. La cisteína se puede sintetizar fácilmente en NAC (N-acetilcisteína) por reacción con un agente de acetilación, y en condiciones básicas, se puede sintetizar en SCMC (S-carboximetilcisteína) por reacción con ácido haloacético. Estos derivados de cisteína se usan principalmente como materiales farmacéuticos, incluyendo remedios para la tos, agentes para aliviar la tos y agentes terapéuticos para la bronquitis, el asma bronquial y el dolor de garganta.

### Modo para la invención

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Debe entenderse, sin embargo, que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

### Ejemplo 1: Identificación de proteínas de membrana novedosas que tienen actividad exportadora de O-fosfoserina

Para identificar proteínas de membrana de *E. coli* que están implicadas en la exportación de O-fosfoserina, se realizó un cribado usando la colección de ADN genómico de *Escherichia coli* K12\_W3110 (ATCC 27325).

Específicamente, para establecer las condiciones en las que se inhibe el crecimiento de *E. coli* mediante OPS, se construyó una cepa plataforma que produce OPS. La cepa plataforma para el cribado era un microorganismo recombinante mutado para reducir la actividad de fosfoserina fosfatasa endógena (SerB) en la cepa de *E. coli* normal W3110 y se denominó "CA07-0012" (KCCM11212P; Publicación de Patente Coreana N.º 10-2012-0041115). Usando la cepa que produce OPS CA07-0012, se establecieron condiciones de cribado óptimas que muestran una inhibición del crecimiento añadiendo adicionalmente OPS al medio.



A continuación, la colección genómica de plásmidos de W3110 se transformaron en CA07-0012 mediante electroporación (van der Rest *et al.* 1999), y se seleccionaron las colonias que muestran la eliminación de la inhibición del crecimiento bajo condiciones medias, que contienen una cantidad excesiva de OPS. Los plásmidos se obtuvieron de las colonias seleccionadas, y las secuencias de nucleótidos de los mismos se analizaron mediante una técnica de secuenciación. Como resultado, se identificaron dos proteínas de membrana de *E. coli* implicadas en eliminar la inhibición del crecimiento bajo condiciones medias, que contienen una cantidad excesiva de OPS.

Las dos proteínas de membrana de *E. coli* se identificaron como *yggT* y *macB*, que codifican la proteína de membrana interna predicha (SEQ ID NO:1) y el sistema de transporte de exportación de macrólido MacAB-TolC - subunidad de membrana (SEQ ID NO:2), respectivamente (Ito T, Uozumi N, Nakamura T, Takayama S, Matsuda N, Aiba H, Hemmi H, Yoshimura T (2009). "The implication of YggT of Escherichia coli in osmotic regulation." Biosci Biotechnol Biochem 73(12); 2698-704. PMID: 19966467, Pao SS, Paulsen IT, Saier MH (1998). "Major facilitator superfamily." Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62(1); 1-34. PMID: 9529885).

**Ejemplo 2: Construcción de vectores que sobreexpresan *yggT* y *macB***

Se construyeron vectores que expresan cada uno de los genes para examinar si la actividad exportadora de OPS está potenciada cuando los genes *YggT* y *MacB* identificados en el ejemplo 1, que están implicados en eliminar la inhibición del crecimiento mediante O-fosfoserina, están potenciados en cepas que producen OPS.

Dado que los autores de la presente invención confirmaron que la concentración de OPS incrementaba cuando se potenció el transportador de homoserina/homoserina lactona RhtB en la cepa que produce OPS (Publicación de Patente Coreana N.º 10-2012-0041115), se usó la cepa con RhtB potenciado como control positivo en un experimento para examinar la productividad de OPS. Además, también se evaluaron los transportadores de exportación de múltiples fármacos EmrD y YcaD MFS que pertenecen a la superfamilia del facilitador principal (MFS), a la que pertenece MacB.

En este ejemplo, se obtuvieron un fragmento del gen *yggT* (SEQ ID NO:3; número de acceso: b3473) que codifica *YggT* (proteína de membrana interna predicha) y un fragmento del gen *macB* (SEQ ID NO:4; número de acceso: b2077) que codifica *MacB* (sistema de transporte de exportación de macrólido MacAB-TolC - subunidad de membrana) mediante PCR usando el ADN genómico de W3110 como molde.

Las secuencias cebadoras usadas para construir los vectores que expresan cada una de las proteínas de membrana de *E. coli* se muestran en la tabla 1 a continuación.

**Tabla 1**

[Tabla 1]

Genes	Cebadores(5'->3')	SEQ ID NO	Vectores
rhtB	GATATCATGACCTTAG AATGGTGG	SEQ ID NO:9	pCL-PrhtB-rhtB
	AAGCTTTCACGCATGCCTCGCC GA	SEQ ID NO:10	
yggT	GATATCATGAATACGTTGACTT TCCTGCTTTC	SEQ ID NO:5	pCL-PrhtB-yggT
	AAGCTTTCATAACGCCATCCAC AGCC	SEQ ID NO:6	

macB	GATATCATGACGCCTTTGCTCG AATTA	SEQ ID NO:7	pCL-PrhtB-macB
	AAGCTTTTACTCTCGTGCCAGA GCATCT	SEQ ID NO:8	
emrD	GATATCATGAAAAGGCAAAGA AACGTCAA	SEQ ID NO:11	pCL-PrhtB-emrD
	AAGCTTTTAAACGGGCTGCCCC T	SEQ ID NO:12	
ycaD	GATATCATGTCCACGTATACCC AGCCTG	SEQ ID NO:13	pCL-PrhtB-ycaD
	AAGCTTTTACACGTGAGCAACG GGTTT	SEQ ID NO:14	
pCL1920	AAGCTTCGGGCCTCTTCGCTAT TACGC	SEQ ID NO:15	
	AAGCTTAGGCTTACCCGTCTTA CTGTC	SEQ ID NO:16	

Específicamente, se realizó la PCR para yggT usando los cebadores de SEQ ID NO:5 y 6, y la PCR para macB se realizó usando los cebadores de SEQ ID NO:7 y 8. Los cebadores usados en la PCR se construyeron basándose en la información del gen K12 W3110 (número de acceso de GenBank AP 003471) depositado en el NIH GenBank y las secuencias de nucleótidos circundantes. Cada uno de los fragmentos de gen amplificados se trató con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII* y se clonó en los sitios de enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII* de un vector pCL-PrhtB que comprende el promotor del gen *rhtB* de *E. coli* insertado en un vector pCL1920 (GenBank N.º AB236930), de este modo se construyen pCL-PrhtB-yggT, pCL-PrhtB-macB, pCL-PrhtB-emrD y pCL-PrhtB-ycaD.

Además, cada fragmento de gen que comprende el promotor *rhtB* se amplificó usando cada uno de los cinco plásmidos construidos como molde y los cebadores de SEQ ID NOS: 15 y 16. Cada uno de los fragmentos amplificados se trató con la enzima de restricción *HindIII* y se clonó en pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC (Publicación de Patente Coreana N.º 10-2012-0041115) que comprende el gen *serA* resistente a retroalimentación de serina y el gen *serC*, de este modo se construyen pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-*rhtB*, pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-yggT, pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-macB, pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-emrD y pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-ycaD.

### **Ejemplo 3: Construcción de cepas con YggT y MacB potenciados y evaluación de la productividad de O-fosfoserina**

Cada uno de los cinco plásmidos construido en el ejemplo 3 se introdujo en la cepa que produce OPS CA07-0012, y a continuación se evaluaron las productividades de O-fosfoserina de las cepas resultantes.

Específicamente, cada una de las cepas se sembró en placa sobre medio sólido LB y se cultivó durante la noche en una incubadora a 33 °C. Cada una de las cepas cultivadas durante la noche sobre el medio sólido LB se inoculó en un medio de titulación de 25 ml mostrado en la tabla 2 a continuación, y a continuación se incubó y se cultivó a 34,5 °C y 200 rpm durante 30 horas. Los resultados del cultivo se muestran en la tabla 3.

Tabla 2

[Tabla 2]

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 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	5 mg
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	10 mg
L-glicina	2,5 g
Extracto de levadura	3 g
Carbonato cálcico	30 g
pH	6,8

Tabla 3

[Tabla 3]

Nombre de la cepa	OD562nm	Consumo de glucosa (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0012	35	32	1,1
CA07-0012 / pCL-PrhtB-rhtB	40	35	1,3
CA07-0012 / pCL-PrhtB-yggT	37	34	1,6
CA07-0012 / pCL-PrhtB-macB	41	32	1,5
CA07-0012 / pCL-PrhtB-emrD	38	34	1,2
CA07-0012 / pCL-PrhtB-ycaD	37	33	0,9

5 Como se puede ver en la tabla 3 anterior, cuando el gen *yggT* o *macB* de la proteína de membrana de *E. coli* se introdujo adicionalmente en la cepa CA07-0012 de *E. coli*, se incrementó significativamente la producción de O-fosfoserina en la cepa en comparación con la de control CA07-0012 y las cepas que tienen *rhtB*, *emrD* o *ycaD* potenciados.

10 Además, usando la cepa CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC (KCCM11103P; Publicación de Patente Coreana N.º 102012004115) que produce OPS que tiene una productividad de OPS incrementada como resultado de potenciar las actividades de SerA (D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa) y SerC (3-fosfoserina aminotransferasa) que están implicadas en la ruta de biosíntesis de OPS, se confirmó el incremento en productividad de OPS mediante la actividad exportadora de OPS de las proteínas de membrana de *E. coli* *YggT* y *MacB* de la presente invención. Los resultados se muestran en la tabla 4 a continuación.

15

Tabla 4

[Tabla 4]

Nombre de la cepa	OD562 nm	Consumo de glucosa (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-serC	30	27	2,4
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-serC-PrhtB-rhtB	32	28	2,8
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-serC-PrhtB-yggT	28	26	3,0
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-serC-PrhtB-macB	27	27	2,8
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-serC-PrhtB-emrD	33	29	2,3
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-serC-PrhtB-ycaD	34	28	1,9

Como se puede ver en la tabla 4 anterior, cuando la proteína de membrana de *E. coli* se introdujo adicionalmente en CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC que tiene una productividad potenciada de OPS en comparación con la cepa CA07-0012 de *E. coli*, la producción de OPS en la cepa que tiene una actividad potenciada del gen de proteína yggT o macB incrementó en aproximadamente un 120 % en comparación con la de la cepa control, similar a los resultados mostrados en la tabla 3 anterior, mientras que la producción de OPS en la cepa comparativa que tiene emrD o ycaD potenciados disminuyó en comparación con la de la cepa control.

Además, CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-yggT que es un ejemplo representativo del microorganismo que produce OPS que tiene una actividad potenciada de YggT de SEQ ID NO:1 se denominó "*Escherichia coli* CA07-0228" y se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, reconocido como una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest, a 7 de marzo de 2013 con el número de acceso KCCM11399P. También, CA07-0022/pCL-Prmf-serA\*(G336V)-serC-PrhtB-macB que es un ejemplo representativo de la cepa que produce OPS que tiene una actividad potenciada de MacB de SEQ ID NO:2 se denominó "*Escherichia coli* CA07-0229" y se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, reconocido como una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest, a 7 de marzo de 2013 con el número de acceso KCCM11400P.

Los resultados descritos anteriormente indican que las proteínas YggT y MacB de la presente invención tienen excelentes actividades exportadoras de OPS, a diferencia de otras proteínas que pertenecen a la misma familia, lo que sugiere que las proteínas de la presente invención son útiles para la producción de OPS.

#### **Ejemplo 4: Examen de funciones de YggT y MacB**

Entre las muestras confirmadas para producir OPS en el ejemplo 3, se usaron la muestra de control negativo que no tiene proteína de membrana potenciada y las muestras que tienen proteínas YggT o MacB potenciadas. Específicamente, se eliminó completamente la OPS exportada al medio, y a continuación solo se recogieron y rompieron las células. A continuación, se midió la concentración de OPS en las células usando un instrumento de HPLC, y los resultados de la medición se muestran en la FIG. 1.

Como resultado, se mostró que la de concentración OPS intracelular de las cepas que tienen YggT o MacB potenciados se redujo en un 30 % en comparación con la del control. Dichos resultados sugieren que yggT y macB funcionan para exportar OPS de las células, indicando que, cuando se potencian yggT o macB en una cepa que produce OPS, puede funcionar para exportar OPS de las células de la cepa, incrementando de este modo la producción de OPS (FIG. 1).

[Consta sello ilegible]

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL  
DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS FINES DEL  
PROCEDIMIENTO DE PATENTES  
FORMULARIO INTERNACIONAL

PARA. CJ Cheiljedang Corporation      RECIBO EN EL CASO DE UN ORIGINAL  
CJ CHEILJEDANG CENTER,      emitido de conformidad con la Regla 7.1  
330, DONGHO-RO,      por la AUTORIDAD DEPOSITARIA  
JUNG-GU, SEÚL 100-400,      INTERNACIONAL identificada al final de  
REPÚBLICA DE COREA      esta página

<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: <i>Escherichia coli</i> CA07-0228	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO KCCM11399P
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompañó por:	
<input type="checkbox"/> una descripción científica <input type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marque con una cruz donde corresponda)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que recibió el 07 de Marzo de 2013. (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</b>	
Nombre: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos Dirección: 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong Seodaemun-gu Seúl 120-091 República de Corea	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) la facultad de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o del (de los) funcionario(s) autorizado(s):  Fecha: 07 de Marzo de 2013. [Consta sello ilegible]

<sup>1</sup>Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es la fecha en que se adquirió el estado de la autoridad depositaria internacional; cuando un depósito realizado fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de la autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, dicha fecha es la fecha en la que la autoridad depositaria internacional recibió el microorganismo.

[Consta sello ilegible]

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL  
DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO DE  
PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

PARA. CJ Cheiljedang Corporation  
CJ CHEILJEDANG CENTER,  
330, DONGHO-RO,  
JUNG-GU, SEÚL 100-400,  
REPÚBLICA DE COREA

RECIBO EN EL CASO DE UN ORIGINAL  
emitido de conformidad con la Regla 7.1 por la  
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL  
identificada al final de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: <i>Escherichia coli</i> CA07-0229	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL: KCCM11400P
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo I anterior se acompañó por: <input type="checkbox"/> una descripción científica <input type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marque con una cruz donde corresponda)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo I anterior, que recibió el 07 de Marzo de 2013. (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos Coreano Dirección: 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong Seodaemun-gu Seúl 120-091 República de Corea	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) la facultad de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o del (de los) funcionario(s) autorizado(s):  Fecha: 07 de Marzo de 2013.  [Consta sello ilegible]

<sup>1</sup>Cuando se aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha es la fecha en que se adquirió el estado de la autoridad depositaria internacional; cuando un depósito realizado fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de la autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito en virtud del Tratado de Budapest, dicha fecha es la fecha en la que la autoridad depositaria internacional recibió el microorganismo.

<110> CJ CheilJedang Corporation

5 <120> Proteína de exportación de O-fosfoserina novedosa y procedimiento para producir O-fosfoserina usando la misma

<130> OPA14017-PCT

<150>KR 10-2013-0053438

<151> 10/05/2013

<160> 16

10 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 188

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(188)

<223> Proteína de membrana interna predicha, YggT

<400> 1

ES 2 737 098 T3

Met Asn Thr Leu Thr Phe Leu Leu Ser Thr Val Ile Glu Leu Tyr Thr  
 1 5 10 15

Met Val Leu Leu Leu Arg Ile Trp Met Gln Trp Ala His Cys Asp Phe  
 20 25 30

Tyr Asn Pro Phe Ser Gln Phe Val Val Lys Val Thr Gln Pro Ile Ile  
 35 40 45

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

Ser Leu Leu Val Ala Tyr Ile Leu Ser Phe Ile Lys Ala Ile Val Leu  
 65 70 75 80

Phe Lys Val Val Thr Phe Leu Pro Ile Ile Trp Ile Ala Gly Leu Leu  
 85 90 95

Ile Leu Leu Lys Thr Ile Gly Leu Leu Ile Phe Trp Val Leu Leu Val  
 100 105 110

Met Ala Ile Met Ser Trp Val Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ile Glu Tyr  
 115 120 125

Val Leu Ile Gln Leu Ala Asp Pro Leu Leu Arg Pro Ile Arg Arg Leu  
 130 135 140

Leu Pro Ala Met Gly Gly Ile Asp Phe Ser Pro Met Ile Leu Val Leu  
 145 150 155 160

Leu Leu Tyr Val Ile Asn Met Gly Val Ala Glu Val Leu Gln Ala Thr  
 165 170 175

Gly Asn Met Leu Leu Pro Gly Leu Trp Met Ala Leu  
 180 185

<210> 2

<211> 648

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(648)

<223> sistema de transporte de eflujo de macrólido MacAB-ToIC - subunidad de membrana (MacB)

10 <400> 2



ES 2 737 098 T3

Met Thr Pro Leu Leu Glu Leu Lys Asp Ile Arg Arg Ser Tyr Pro Ala  
1 5 10 15

Gly Asp Glu Gln Val Glu Val Leu Lys Gly Ile Ser Leu Asp Ile Tyr  
20 25 30

Ala Gly Glu Met Val Ala Ile Val Gly Ala Ser Gly Ser Gly Lys Ser  
35 40 45

Thr Leu Met Asn Ile Leu Gly Cys Leu Asp Lys Ala Thr Ser Gly Thr  
50 55 60

Tyr Arg Val Ala Gly Gln Asp Val Ala Thr Leu Asp Ala Asp Ala Leu  
65 70 75 80

Ala Gln Leu Arg Arg Glu His Phe Gly Phe Ile Phe Gln Arg Tyr His  
85 90 95

Leu Leu Ser His Leu Thr Ala Glu Gln Asn Val Glu Val Pro Ala Val  
100 105 110

Tyr Ala Gly Leu Glu Arg Lys Gln Arg Leu Leu Arg Ala Gln Glu Leu  
115 120 125

Leu Gln Arg Leu Gly Leu Glu Asp Arg Thr Glu Tyr Tyr Pro Ala Gln  
130 135 140

Leu Ser Gly Gly Gln Gln Gln Arg Val Ser Ile Ala Arg Ala Leu Met  
145 150 155 160

Asn Gly Gly Gln Val Ile Leu Ala Asp Glu Pro Thr Gly Ala Leu Asp  
165 170 175

Ser His Ser Gly Glu Glu Val Met Ala Ile Leu His Gln Leu Arg Asp  
180 185 190

Arg Gly His Thr Val Ile Ile Val Thr His Asp Pro Gln Val Ala Ala  
195 200 205

Gln Ala Glu Arg Val Ile Glu Ile Arg Asp Gly Glu Ile Val Arg Asn  
210 215 220

Pro Pro Ala Ile Glu Lys Val Asn Val Thr Gly Gly Thr Glu Pro Val  
225 230 235 240

Val Asn Thr Val Ser Gly Trp Arg Gln Phe Val Ser Gly Phe Asn Glu  
245 250 255

Ala Leu Thr Met Ala Trp Arg Ala Leu Ala Ala Asn Lys Met Arg Thr  
260 265 270

ES 2 737 098 T3

Leu Leu Thr Met Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Ala Ser Val Val Ser  
 275 280 285  
 Ile Val Val Val Gly Asp Ala Ala Lys Gln Met Val Leu Ala Asp Ile  
 290 295 300  
 Arg Ser Ile Gly Thr Asn Thr Ile Asp Val Tyr Pro Gly Lys Asp Phe  
 305 310 315 320  
 Gly Asp Asp Asp Pro Gln Tyr Gln Gln Ala Leu Lys Tyr Asp Asp Leu  
 325 330 335  
 Ile Ala Ile Gln Lys Gln Pro Trp Val Ala Ser Ala Thr Pro Ala Val  
 340 345 350  
 Ser Gln Asn Leu Arg Leu Arg Tyr Asn Asn Val Asp Val Ala Ala Ser  
 355 360 365  
 Ala Asn Gly Val Ser Gly Asp Tyr Phe Asn Val Tyr Gly Met Thr Phe  
 370 375 380  
 Ser Glu Gly Asn Thr Phe Asn Gln Glu Gln Leu Asn Gly Arg Ala Gln  
 385 390 395 400  
 Val Val Val Leu Asp Ser Asn Thr Arg Arg Gln Leu Phe Pro His Lys  
 405 410 415  
 Ala Asp Val Val Gly Glu Val Ile Leu Val Gly Asn Met Pro Ala Arg  
 420 425 430  
 Val Ile Gly Val Ala Glu Glu Lys Gln Ser Met Phe Gly Ser Ser Lys  
 435 440 445  
 Val Leu Arg Val Trp Leu Pro Tyr Ser Thr Met Ser Gly Arg Val Met  
 450 455 460  
 Gly Gln Ser Trp Leu Asn Ser Ile Thr Val Arg Val Lys Glu Gly Phe  
 465 470 475 480  
 Asp Ser Ala Glu Ala Glu Gln Gln Leu Thr Arg Leu Leu Ser Leu Arg  
 485 490 495  
 His Gly Lys Lys Asp Phe Phe Thr Trp Asn Met Asp Gly Val Leu Lys  
 500 505 510  
 Thr Val Glu Lys Thr Thr Arg Thr Leu Gln Leu Phe Leu Thr Leu Val  
 515 520 525  
 Ala Val Ile Ser Leu Val Val Gly Gly Ile Gly Val Met Asn Ile Met  
 530 535 540  
 Leu Val Ser Val Thr Glu Arg Thr Arg Glu Ile Gly Ile Arg Met Ala  
 545 550 555 560  
 Val Gly Ala Arg Ala Ser Asp Val Leu Gln Gln Phe Leu Ile Glu Ala  
 565 570 575  
 Val Leu Val Cys Leu Val Gly Gly Ala Leu Gly Ile Thr Leu Ser Leu  
 580 585 590  
 Leu Ile Ala Phe Thr Leu Gln Leu Phe Leu Pro Gly Trp Glu Ile Gly  
 595 600 605

ES 2 737 098 T3

Phe Ser Pro Leu Ala Leu Leu Leu Ala Phe Leu Cys Ser Thr Val Thr  
 610 615 620  
 Gly Ile Leu Phe Gly Trp Leu Pro Ala Arg Asn Ala Ala Arg Leu Asp  
 625 630 635 640  
 Pro Val Asp Ala Leu Ala Arg Glu  
 645

<210> 3

<211> 567

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<220>

<221> gen

<222> (1)..(567)

<223> yggT

10 <400> 3

atgaatacgt tgactttcct gctttcaacg gtcattgagc tgtataccat ggtgctgtta 60  
 ttacgcacatc ggatgcagtg ggctcattgt gatttttaca accccttctc acagtttgta 120  
 gtgaaggtaa cgcagccaat tatcgggcca ctgcgccgcg ttattccggc aatggggcca 180  
 attgacagcg cctcgctgct ggttgcctat attctcagtt ttatcaaagc catcgctgctg 240  
 tttaaagtgg tgaccttctc gccaatcatc tggattgccg gtttactgat tctgctgaaa 300  
 accatcggcc tgctgatttt ctgggtcctg ctggtgatgg cgattatgag ctgggtaagc 360  
 caggggcgta gcccgattga atacgtgctg attcagctgg ccgatccgct gctgcgcccg 420  
 attcgcgcc tgctaccggc aatgggtggg attgatttct cgccgatgat cctcgttctg 480  
 ctgctgtatg tcatcaatat ggggtgctgca gaagtattac aggcaaccgg aaatatgctg 540  
 ctgccagggc tgtggatggc gttatga 567

<210> 4

<211> 1947

<212> ADN

15 <213> Escherichia coli

<220>

<221> gen

<222> (1)..(1947)

<223> macB

20 <400> 4

ES 2 737 098 T3

atgacgcctt tgctogaatt aaaggatatt cgtcgcagct atcctgccgg tgatgagcag	60
gttgaggtgc tgaagggcat cagcctcgat atttatgcgg gtgagatggt cgcgattgtt	120
ggcgcttcgg gttccggtaa atcgaccctg atgaatattc tcggctgtct ggataaggcc	180
accagcggca cctatcgcgt cgccggtcag gatggtgcc a cgctggacgc cgatgcgctg	240

ES 2 737 098 T3

gcgcaactgc gccgcgagca tttcggcttt attttccagc gttaccattt gctttcgcac 300  
 ttaaccgccg agcagaaagt tgaagtacct gccgtctatg ctggtcttga gcggaaacag 360  
 cgactgcttc gtgccagga gttgctgcaa cggctggggc tggaagaccg tacagagtat 420  
 tatccggcac agctttcggg tggtcagcaa cagcgcgtca gcatcgcgcg ggcattgatg 480  
 aacggtggtc aggtaattct tgccgatgaa ccaaccggcg cactggacag ccattctggc 540  
 gaagaggtga tggcgatcct gcatcagctg cgcgatcgtg ggcatacggg gattatcgtc 600  
 acccacgac cgcaggtcgc tgctcaggcc gagcgggtga tcgaaattcg cgacggcgaa 660  
 attgtgcgca atcctcccgc cattgaaaa gtgaatgta ctggcgggac ggaacctggt 720  
 gtcaacacgg tgtctggctg gcggcagttt gtcagcgggt ttaacgaggc gctgacgatg 780  
 gcatggcggg cgctggcagc gaataaaatg cgtactttac tgaccatgct ggggattatt 840  
 atcggatttg cgtcgggtgt ttccattgtc gtggtgggtg acgccgcaa acaaatggtg 900  
 ctggcggata ttcgttctat tggtagaat actattgatg tctatcccgg gaaagatttt 960  
 ggcgatgacg atccgcaata tcagcaggcg ctgaagtacg acgacttaat cgccatccaa 1020  
 aaacaaccgt gggtcgcctc agccacacct gccgtctcgc aaaacctgcg cctgcgttat 1080  
 aacaatggtg atgttgctgc cagtgccaat ggcgtgagcg gcgattattt taatgtctat 1140  
 ggcatgacct tcagtgaagg aaacaccttt aatcaggagc agctgaacgg tcgtgcgcag 1200  
 gtcgtggttc tcgacagtaa tactcgccgc cagcttttcc ccataaagc agatgtggtt 1260  
 ggcgaggtga ttctggtcgg caatatgcc gccagagtca ttggtgtggc ggaagaaaa 1320  
 cagtcgatgt ttggtagcag taaagtgtg cgtgtctggc taccttacag cacgatgtcc 1380  
 gggcgagtta tgggccagtc gtggcttaac tccattactg tcagggtgaa agaaggattt 1440  
 gacagcgcgc aggcggaaca gcaactcacg cgtttacttt cactgcgcca cggaagaag 1500  
 gatttcttta cctggaacat ggacggcgtc ttgaaaactg ttgaaaagac cacacgtact 1560  
 ttacaactgt ttctgacgct ggtggcgggtg atttcgtgg tggtgggagg tattggtgta 1620  
 atgaatatta tgctgggtgc agtgaccgag cggacgcggg aaattggcat tcgcatggct 1680  
 gtaggtgccc gagcaagcga tgttttgcaa cagttcctga tcgaagccgt actggtttgc 1740  
 ctggtcgggtg gcgcggtggg aataaactg tcaactgtaa ttgctttcac cttgcagctt 1800  
 ttcttaccgg gctgggagat tggtttttca ccgttggcgc tgctgctggc gtttctctgc 1860  
 tcgacgggtc ccgggatttt atttggctgg ttaccgcac gaaatgcggc acgactggat 1920  
 ccagtagatg ctctggcacg agagtaa 1947

<210> 5

<211> 32

<212> ADN

## ES 2 737 098 T3

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador para la amplificación de yggT para construir pCL-PrhtB-yggT  
<400> 5  
5      gatatcatga atacgttgac ttcctgctt tc      32  
<210> 6  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
10      <220>  
<223> cebador para la amplificación de yggT para construir pCL-PrhtB-yggT  
<400> 6  
    aagctttcat aacgccatcc acagcc      26  
<210> 7  
15      <211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador para la amplificación de macB para construir pCL-PrhtB-macB  
20      <400> 7  
    gatatcatga cgccttgct cgaatta      27  
<210> 8  
<211> 28  
<212> ADN  
25      <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador para la amplificación de macB para construir pCL-PrhtB-macB  
<400> 8  
    aagcttttac tctcgtgcca gagcatct      28  
30      <210> 9  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
35      <223> cebador para la amplificación de rhtB para construir pCL-PrhtB-rhtB  
<400> 9

ES 2 737 098 T3

gatatcatga ccttagaatg gtgg 24  
<210> 10  
<211> 24  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador para la amplificación de rhtB para construir pCL-PrhtB-rhtB  
<400> 10  
aagctttcac gcatgcctcg ccga 24  
10 <210> 11  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
15 <223> cebador para la amplificación de emrD para construir pCL-PrhtB-emrD  
<400> 11  
gatatcatga aaaggcaaag aaacgtcaa 29  
<210> 12  
<211> 23  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador para la amplificación de emrD para construir pCL-PrhtB-emrD  
<400> 12  
25 aagcttttaa acgggctgcc cct 23  
<210> 13  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
30 <220>  
<223> cebador para la amplificación de ycaD para construir pCL-PrhtB-ycaD  
<400> 13  
gatatcatgt ccacgtatac ccagcctg 28  
<210> 14  
35 <211> 27  
<212> ADN

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador para la amplificación de ycaD para construir pCL-PrhtB-ycaD  
<400> 14  
5 aagcttttac acgtgagcaa cgggttt 27  
<210> 15  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
10 <220>  
<223> cebador para la amplificación de genes pCL-PrhtB para construir genes pCL-Prmf-serA(G336V)-  
serC\_PrhtB  
<400> 15  
aagcttcggg cctcttcgct attacgc 27  
15 <210> 16  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> cebador para la amplificación de genes pCL-PrhtB para construir genes pCL-Prmf-serA(G336V)-  
serC\_PrhtB  
<400> 16  
aagcttaggc ttaccgtct tactgtc 27

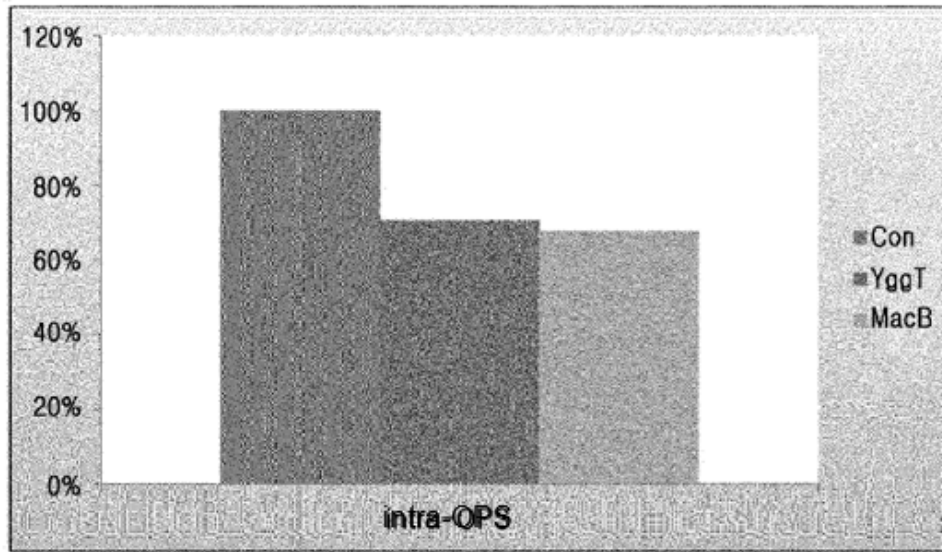


## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un procedimiento para producir O-fosfoserina (OPS), que comprende cultivar un microorganismo que produce O-fosfoserina que se ha modificado para potenciar una actividad de un polipéptido, en el que el polipéptido es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 que tiene una actividad exportadora de O-fosfoserina,
- 10 en el que la potenciación de la actividad del polipéptido se realiza mediante uno o más procedimientos seleccionados del grupo que consiste en un procedimiento para incrementar el número de copias intracelulares de un gen que codifica el polipéptido, un procedimiento para introducir una mutación en una secuencia reguladora de expresión para el gen cromosómico que codifica el polipéptido, un procedimiento para reemplazar una secuencia reguladora de expresión para el gen cromosómico que codifica el polipéptido con una secuencia que tiene una fuerte actividad, un procedimiento para sustituir el gen cromosómico que codifica el polipéptido con un gen mutado para incrementar la actividad del polipéptido, y un procedimiento para introducir una mutación en el gen cromosómico que codifica el polipéptido para potenciar la actividad del polipéptido.
- 15 **2.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo que produce O-fosfoserina además se ha modificado para reducir una actividad de fosfoserina fosfatasa endógena.
- 3.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo que produce O-fosfoserina además se ha modificado para potenciar una actividad de fosfoglicerato deshidrogenasa o fosfoserina aminotransferasa.
- 20 **4.** Un microorganismo que produce O-fosfoserina que se ha modificado para potenciar una actividad de un polipéptido, en el que el polipéptido es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o 2 que tiene una actividad exportadora de O-fosfoserina,
- 25 en el que la potenciación de la actividad del polipéptido se realiza mediante uno o más procedimientos seleccionados del grupo que consiste en un procedimiento para incrementar el número de copias intracelulares de un gen que codifica el polipéptido, un procedimiento para introducir una mutación en una secuencia reguladora de expresión para el gen cromosómico que codifica el polipéptido, un procedimiento para reemplazar una secuencia reguladora de expresión para el gen cromosómico que codifica el polipéptido con una secuencia que tiene una fuerte actividad, un procedimiento para sustituir el gen cromosómico que codifica el polipéptido con un gen mutado para incrementar la actividad del polipéptido, y un procedimiento para introducir una mutación en el gen cromosómico que codifica el polipéptido para potenciar la actividad del polipéptido.
- 30 **5.** El microorganismo de la reivindicación 4, en el que el microorganismo además se ha modificado para reducir una actividad de fosfoserina fosfatasa endógena.
- 6.** El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el microorganismo además se ha modificado para potenciar una actividad de fosfoglicerato deshidrogenasa o fosfoserina aminotransferasa.
- 7.** Un procedimiento para producir cisteína o sus derivados, que comprende las etapas de:
- 35 a) cultivar el microorganismo de la reivindicación 4 para producir O-fosfoserina (OPS); y
- b) hacer reaccionar la O-fosfoserina, producida en la etapa a), con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo que expresa OPSS.
- 8.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el sulfuro es uno o más seleccionado del grupo que consiste en Na<sub>2</sub>S, NaSH, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>S y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

40

[Fig. 1]



[Fig. 2]

