

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 413**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12P 13/06** (2006.01)

**C12P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2015 PCT/KR2015/008336**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16024771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2015 E 15832358 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3181685**

54 Título: **Microorganismo productor de O-fosfoserina y procedimiento de producción de O-fosfoserina o L-cisteína mediante el uso del mismo**

30 Prioridad:

**12.08.2014 KR 20140104670**

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

**08.04.2020**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu  
Seoul 04560 , KR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

ES 2 753 413 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Microorganismo productor de O-fosfoserina y procedimiento de producción de O-fosfoserina o L-cisteína mediante el uso del mismo

5

### Campo técnico

La presente invención se refiere a un microorganismo capaz de producir O-fosfoserina y a un procedimiento para producir O-fosfoserina, cisteína o un derivado de cisteína mediante el uso del microorganismo.

10

### Técnica antecedente

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

15

Los procedimientos conocidos para producir L-cisteína mediante el uso de microorganismos incluyen: 1) un procedimiento para convertir biológicamente D,L-ATC en L-cisteína mediante el uso de microorganismos, 2) un procedimiento para producir L-cisteína mediante fermentación directa usando *E. coli* (EP0885962B; Wada M y Takagi H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006), y 3) un procedimiento para producir O-fosfoserina ("OPS", en lo sucesivo) mediante fermentación mediante el uso de microorganismos, y convertir OPS en L-cisteína haciendo reaccionar OPS con un sulfuro bajo la acción catalítica de O-fosfoserina sulfhidrilasa ("OPSS", en lo sucesivo) (Patente Coreana N.º 1381048).

20

25

En particular, para la producción de cisteína por el procedimiento 3) con alto rendimiento, el precursor, OPS, debe producirse en cantidades excesivas. A este respecto, los presentes inventores han realizado grandes esfuerzos para descubrir un factor de exportación apropiado que permita que la O-fosfoserina producida en un microorganismo productor de OPS se exporte de las células sin problemas.

30

### Divulgación

#### Problema técnico

En estas circunstancias, los presentes inventores descubrieron dos nuevos polipéptidos productores de OPS, YhhS y MdtD, y confirmaron que OPS puede exportarse eficazmente desde un microorganismo productor de OPS activando los dos polipéptidos, completando así la presente invención.

35

#### Solución técnica

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo productor de OPS, en el que la actividad de un polipéptido capaz de exportar OPS se mejora en comparación con su actividad endógena.

40

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir OPS que incluye: cultivar un microorganismo productor de OPS en un medio y separar OPS del microorganismo productor de OPS o su cultivo.

45

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar usos de la producción o exportación de OPS por el polipéptido.

50

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir cisteína o su derivado que incluye: a) producir OPS mediante el cultivo de un microorganismo productor de OPS, en el que la actividad de un polipéptido capaz de exportar OPS se mejora en comparación con su actividad endógena, en un medio; y b) hacer reaccionar la OPS producida en a) o un cultivo que contiene la misma con un sulfuro, en presencia de OPS sulfhidrilasa o un microorganismo capaz de expresarla.

55

#### Efectos ventajosos de la invención

El polipéptido con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 de la presente invención tiene una excelente capacidad de exportación de OPS. Por consiguiente, cuando el polipéptido de la presente invención se aplica a un microorganismo capaz de producir OPS, puede dar como resultado un alto rendimiento de producción de OPS, y también se puede usar eficazmente para la síntesis de L-cisteína, etc.

60

65

### Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un gráfico que ilustra el resultado de la medición del nivel intracelular de OPS mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), después de eliminar todas las OPS exportadas del cultivo del microorganismo recombinante de la presente invención donde se mejoraron las funciones de las proteínas YhhS y MdtD.

### Mejor modo

En un aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo productor de OPS, en el que (a) la actividad de un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y es capaz de exportar O-fosfoserina, se mejora en comparación con su actividad endógena, y en donde: (b-1) la actividad de fosfoserina fosfatasa (SerB) se debilita aún más en comparación con su actividad endógena, y/o (b-2) la actividad de fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA) o fosfoserina aminotransferasa (SerC) se mejora aún más en comparación con su actividad endógena.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "O-fosfoserina" ("OPS", en lo sucesivo) se refiere a un éster de serina y ácido fosfórico que es un componente de muchas proteínas. En particular, la OPS es un precursor de la L-cisteína y puede convertirse en cisteína al reaccionar con un sulfuro bajo la acción catalítica de la OPS sulfhidrilasa (en lo sucesivo denominada "OPSS") (Patente Coreana N.º 1381048). Por consiguiente, es un factor importante para aumentar la producción de OPS en la producción de cisteína y, por lo tanto, se ha requerido desarrollar transportadores que permitan que la OPS intracelular sea secretada eficazmente por las cepas productoras de OPS.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "un polipéptido que tiene la actividad de exportar O-fosfoserina" se refiere a una proteína de membrana que tiene la actividad de exportar la OPS en una célula al exterior de la célula, y específicamente puede ser una membrana proteína derivada de *E. coli*. Se identificaron dos tipos de proteínas de membrana de *E. coli* donde se elimina la inhibición del crecimiento en una condición en la que hay una cantidad excesiva de OPS. Específicamente, las proteínas de membrana identificadas de este modo con capacidad de exportación de OPS son el transportador YhhS MFS (superfamilia del facilitador principal) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y el transportador YegB MFS que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En la presente invención, el transportador YegB MFS se puede usar indistintamente con MdtD. La capacidad de exportación de OPS de la proteína no se conoce hasta que se verifica por primera vez en la presente invención.

Además, el polipéptido puede ser una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y puede incluir, sin limitación, proteínas de membrana que tienen una homología de secuencia de al menos 70% con las secuencias anteriores, específicamente al menos 80%, más específicamente al menos 90%, e incluso más específicamente al menos 95%, siempre que tengan una capacidad de exportación de OPS, que es sustancialmente igual o equivalente a la del polipéptido. Además, es obvio que las variantes de polipéptidos, en las que parte de la secuencia se deletorea, modifica, sustituye o inserta, deben incluirse en el alcance de la presente invención, siempre que sean secuencias de aminoácidos que tengan estas homologías y la OPS - Capacidad de exportación.

Además, la secuencia de polinucleótidos del polipéptido que exhibe capacidad de exportación de OPS puede incluir secuencias de polinucleótidos que codifican los aminoácidos representados por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Además, considerando los codones preferidos por los organismos para expresar el polipéptido basado en la degeneración del código genético, se pueden ejecutar varias modificaciones en la región de codificación dentro del alcance sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido. La secuencia de polinucleótidos puede ser una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, y puede incluir secuencias de nucleótidos que tienen una homología de secuencia de al menos 70% con estas secuencias, pero no se limita a las mismas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "homología" se refiere a un grado de identidad con una secuencia polipeptídica o secuencia polinucleotídica dada, y puede indicarse en porcentaje. Como se usa en la presente memoria descriptiva, la secuencia homóloga que tiene la misma o similar actividad con la secuencia de polipéptidos o secuencia de polinucleótidos dada puede indicarse en términos de "% de homología". El % de homología puede confirmarse usando un software estándar, es decir, BLAST 2.0, para calcular parámetros tales como puntuación, identidad y similitud, o mediante la comparación de secuencias a través de experimentos de hibridación Southern, y la condición de hibridación apropiada que se definirá se puede determinar mediante un procedimiento conocido por un experto en la materia (por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *infra*).

En una realización ejemplar de la presente invención, se confirmó que cuando las actividades de la proteína YhhS (SEQ ID NO: 1) o la proteína MdtD (SEQ ID NO: 2) se mejoraron en un microorganismo capaz de producir OPS, se demostró que el microorganismo tiene una capacidad superior de exportación de OPS a la cepa donde

se mejoró la proteína RhtB (Publicación de Solicitud de Patente Coreana N.º 10-2012-0041115) (un control positivo), o la cepa donde las actividades de los transportadores MFS de EmrD o YcaD fueron mejorados (un grupo experimental). "RhtB" es una proteína de membrana, codificada por el gen *rhtB*, que puede exportar homoserina/homoserina lactona. Como ya se confirmó que la mejora de la actividad de RhtB en una cepa productora de OPS aumenta la capacidad de exportación de OPS en la cepa (Patente Coreana N.º 138104), esto se usó como un control positivo. Cuando las actividades de la proteína RhtB y las proteínas YhhS y MdtD de la presente invención se mejoraron en una cepa productora de OPS, respectivamente, la proteína RhtB y las proteínas YhhS y MdtD de la presente invención exhibieron excelentes capacidades de exportación de OPS a la proteína RhtB. Además, los términos "EmrD" e "YcaD" se refieren a las proteínas transportadoras MFS de *E. coli*, y están codificadas por el gen *emrD* y el gen *ycaD*, respectivamente. EmrD e YcaD, que son proteínas que pertenecen a los transportadores MFS como en las proteínas YhhS y MdtD, se usaron como un grupo experimental para examinar si otras proteínas pertenecen al transportador MFS también pueden exhibir capacidades de exportación de OPS. Como resultado, se confirmó que las proteínas EmrD e YcaD, a diferencia de las proteínas YhhS y MdtD, no exhibían capacidades de exportación de OPS.

Mientras tanto, el polipéptido de la presente invención tiene la capacidad de exportar OPS y, por lo tanto, cuando la actividad del polipéptido aumenta en comparación con su actividad endógena en un microorganismo que tiene una capacidad de producción de OPS, se puede producir OPS de manera eficaz.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "producción de OPS" no solo se refiere a la producción de OPS dentro de una cepa, sino también a la exportación de OPS en una célula al exterior de la célula, por ejemplo, a un medio, y específicamente, la exportación de OPS desde adentro hacia afuera de una célula.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "actividad endógena" se refiere a un estado activo de un polipéptido en un microorganismo en un estado natural, es decir, en un estado no modificado.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "mejora en comparación con su actividad endógena" se refiere a una mayor actividad de un polipéptido en un microorganismo en comparación con la que posee en su estado natural, y es un concepto que incluye la representación de la actividad de un polipéptido particular en un microorganismo que no posee la actividad del polipéptido particular.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "mejora de la actividad" se refiere, aunque no está particularmente limitado a, no solo la atracción de un efecto mayor que la función original debido al aumento en la actividad del polipéptido en sí, sino también el aumento de la actividad de la proteína debido al aumento de la actividad del gen endógeno, la amplificación del gen endógeno por los factores internos o externos, el reemplazo, la modificación o la mutación de un promotor, etc. Específicamente, el aumento de la actividad puede realizarse por procedimientos como un procedimiento para aumentar el número de copias de un gen que codifica el polipéptido en una célula, un procedimiento para modificar la secuencia de regulación de un gen que codifica el polipéptido, un procedimiento para sustituir el gen que codifica el polipéptido en el cromosoma con un gen mutado para aumentar la actividad del polipéptido, un procedimiento para introducir una modificación en el gen que codifica el polipéptido en el cromosoma para mejorar la actividad del polipéptido, etc., pero no se limita a los mismos. Se puede hacer referencia a estos procedimientos para mejorar la actividad de la misma manera para mejorar las actividades de otros polipéptidos de la presente invención.

En lo anterior, el aumento en el número de copias de genes, aunque no está particularmente limitado al mismo, se puede realizar en un estado conectado operativamente a un vector, o al insertarse en el cromosoma dentro de una célula huésped. Específicamente, el procedimiento puede ejecutarse mediante la introducción de un vector, mediante el cual un polinucleótido que codifica la proteína de la presente invención está operativamente conectado a una célula huésped, y puede replicarse y funcionar independientemente de un huésped, en una célula del huésped; o introducir un vector, al que el polinucleótido está operativamente conectado, capaz de insertar el polinucleótido en el cromosoma de la célula huésped, dentro de la célula huésped. La inserción del polinucleótido en el cromosoma se puede realizar utilizando un procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, por recombinación homóloga. Como el vector de la presente invención puede insertarse en el cromosoma mediante recombinación homóloga, puede incluirse adicionalmente un marcador de selección para la confirmación de la inserción en el cromosoma. El marcador de selección se usa para la selección de una célula transformada, es decir, para confirmar si se ha insertado el polinucleótido diana, y se pueden usar marcadores capaces de proporcionar fenotipos seleccionables tales como resistencia a fármacos, requerimiento de nutrientes, resistencia a agentes citotóxicos y proteínas de expresión de superficie, pero no se limitan a los mismos. En las circunstancias en las que se tratan agentes selectivos, solo las células capaces de expresar los marcadores de selección pueden sobrevivir o expresar otros rasgos fenotípicos, y por lo tanto las células transformadas pueden seleccionarse fácilmente.

El vector puede ser una construcción de ADN que incluye la secuencia de polinucleótidos del polinucleótido que codifica la proteína diana, que está operativamente conectada a una secuencia de regulación adecuada para que

la proteína diana pueda expresarse en un huésped apropiado. La secuencia de regulación incluye un promotor capaz de iniciar la transcripción, una secuencia de operador aleatorio para la regulación de la transcripción, una secuencia que codifica un dominio de unión al ribosoma de ARNm adecuado y una secuencia para la regulación de la transcripción y la traducción. El vector, después de transformarse en una célula huésped adecuada, puede replicarse o funcionar independientemente del genoma del huésped, o puede integrarse en el propio genoma del huésped.

El vector usado en la presente invención puede no estar particularmente limitado siempre que el vector sea replicable en la célula huésped, y se puede usar cualquier vector conocido en la técnica. Los ejemplos del vector pueden incluir plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos naturales o recombinantes. Por ejemplo, como vector de fagos o vector de cósmidos, se pueden usar *pWE15*, *M13*, *λMBL3*, *λMBL4*, *XIXII*, *λ4SHII*, *λAPII*, *λt10*, *λt11*, *Charon4A*, *Charon21A*, etc. y como un vector de plásmidos, se pueden usar aquellos basados en *pBR*, *pUC*, *pBluescriptII*, *pGEM*, *pTZ*, *pCL*, *pET*, etc. Específicamente, se pueden usar *pDZ*, *pACYC177*, *pACYC184*, *pCL*, *pECCG117*, *pUC19*, *pBR322*, *pMW118*, *pCC1BAC*, etc.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "transformación" se refiere a un procedimiento de introducción de un vector que incluye un polinucleótido que codifica una proteína diana en una célula huésped, permitiendo de ese modo la expresión del polinucleótido codificado por la proteína en la célula huésped. Para el polinucleótido transformado, no importa si se inserta en el cromosoma de una célula huésped y se ubica en el mismo o se encuentra fuera del cromosoma, siempre que pueda expresarse en la célula huésped. Además, el polinucleótido incluye ADN y ARN que codifican la proteína diana. El polinucleótido puede insertarse en cualquier forma en la medida en que puede introducirse en una célula huésped y expresarse en el mismo. Por ejemplo, el polinucleótido puede introducirse en una célula huésped en forma de un casete de expresión, que es una construcción genética que incluye todos los elementos esenciales necesarios para la autoexpresión, pero no está limitado a los mismos. El casete de expresión puede incluir convencionalmente un promotor conectado operativamente al polinucleótido, una señal de terminación de la transcripción, un dominio de unión al ribosoma y una señal de terminación de la traducción. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión capaz de autorreplicación. Además, el polinucleótido puede introducirse en una célula huésped tal como es, y conectarse operativamente a una secuencia esencial para su expresión en la célula huésped.

Además, como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "operativamente conectado" se refiere a una conexión funcional entre una secuencia promotora, que inicia y media la transcripción del polinucleótido que codifica la proteína diana de la presente invención, y la secuencia génica anterior.

Entonces, la modificación de la secuencia de regulación de la expresión para aumentar la expresión del polinucleótido, aunque no está particularmente limitada a la misma, puede realizarse induciendo una variación en la secuencia del polinucleótido mediante delección, inserción, sustitución conservativa, sustitución no conservativa, o una combinación de los mismos para mejorar aún más la actividad de la secuencia de regulación de la expresión; o reemplazando la secuencia de polinucleótidos con una secuencia de polinucleótidos con una actividad más fuerte. La secuencia de regulación de la expresión, aunque no está particularmente limitada a la misma, puede incluir un promotor, una secuencia de operador, una secuencia que codifica un dominio de unión al ribosoma y una secuencia para regular la terminación de la transcripción y traducción, etc.

Un promotor fuerte, en lugar del promotor original, puede estar conectado al extremo superior de la unidad de expresión del polinucleótido, pero no está limitado al mismo. Los ejemplos de los promotores fuertes conocidos pueden incluir el promotor *cj1* (Patente Coreana N.º 0620092), el promotor *lac*, el promotor *trp*, el promotor *trc*, el promotor *tac*, el promotor *PR* del fago lambda, el promotor *PL* y el promotor *tet*.

Además, la modificación de la secuencia de polinucleótidos en el cromosoma, aunque no está particularmente limitada a la misma, puede realizarse induciendo una variación en la secuencia de regulación de la expresión de la secuencia de polinucleótidos mediante delección, inserción, sustitución conservativa, sustitución no conservativa, o una combinación de los mismos para mejorar aún más la actividad de la secuencia de polinucleótidos; o reemplazando la secuencia de polinucleótidos con una secuencia de polinucleótidos mejorada con una actividad más fuerte.

En general, la introducción y mejora de la actividad de la proteína puede aumentar la actividad o concentración de la proteína correspondiente en relación con la actividad o concentración de una proteína de tipo salvaje o en una cepa de microorganismos de al menos 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, hasta un máximo de 1000% o 2000%, pero no está limitado a ello.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "microorganismo productor de OPS" se refiere a una cepa microbiana procarionta o eucariota capaz de producir OPS en la misma, y específicamente un microorganismo capaz de acumular OPS en el mismo mediante ingeniería genética.

En una realización ejemplar de la presente invención, el microorganismo no está particularmente limitado, sino

que puede ser cualquier microorganismo procariota o eucariota que pueda producir OPS cuando la actividad del polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o 2 se mejora, y específicamente un microorganismo procariota. Los ejemplos del microorganismo pueden incluir cepas microbianas que pertenecen al género *Escherichia*, el género *Erwinia*, el género *Serratia*, el género *Providencia*, el género *Corynebacterium* y el género *Brevibacterium*. Específicamente, el microorganismo puede ser un microorganismo del género *Escherichia*. Más específicamente, puede ser *E. coli*. En particular, un microorganismo de *Escherichia* o del género *Corynebacterium* puede producir OPS y L-serina, porque contiene proteínas SerA, SerC y SerB que son enzimas en la vía de biosíntesis de L-serina (Ahmed Zahoor, Computational and Structural Biotechnology Journal, vol. 3, octubre de 2012; Wendisch VF et al., Curr Opin Microbiol. 2006 jun; 9(3): 268-74; Peters-Wendisch P et al., Appl Environ Microbiol. 2005 nov; 71(11): 7139-44).

Además, en el microorganismo productor de OPS, la actividad de la fosfoserina fosfatasa (SerB) puede debilitarse aún más en comparación con su actividad endógena.

La SerB tiene una actividad de convertir OPS en L-serina, y por lo tanto el microorganismo modificado para reducir la actividad de SerB tiene la propiedad de acumular OPS en el mismo, por lo que es útil para la producción de OPS. La SerB puede ser una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18, pero no está limitada a la misma. Además, la SerB puede incluir una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% o más, específicamente, 90% o más, más específicamente 95% o más, e incluso más específicamente 99% o más, siempre que muestre la actividad de SerB, pero no se limita a la misma. Además, la secuencia de polinucleótidos que codifica SerB puede tener una secuencia de polinucleótidos que codifica los aminoácidos representados por la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

Teniendo en cuenta los codones preferidos por los organismos para expresar el polipéptido basado en la degeneración del código genético, se pueden ejecutar varias modificaciones en el polinucleótido en la región de codificación dentro del alcance sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido. La secuencia de polinucleótidos puede ser una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20, y puede incluir secuencias de nucleótidos que tienen una homología de secuencia del 80% con estas secuencias, y específicamente al menos 90%, pero no está limitada a ello.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "la atenuación en comparación con su actividad endógena" se refiere a una reducción de la actividad de la proteína en comparación con la que posee en su estado natural, y también incluye cuándo se elimina su actividad.

La atenuación es un concepto que se refiere a un caso en que la actividad de una proteína se reduce en comparación con la que originalmente poseía el microorganismo debido a una modificación en el gen que codifica la proteína, etc., un caso en el que el nivel de expresión de proteína en general es menor que la de la cepa de tipo natural del microorganismo debido a la inhibición de la expresión o la inhibición de la traducción del gen que codifica el mismo, o un caso cuando el gen no se expresa en absoluto, y un caso cuando el gen se expresa pero no exhibe actividad.

La atenuación o inactivación de una actividad proteica se puede lograr mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de los procedimientos pueden incluir un procedimiento para sustituir el gen que codifica la proteína en el cromosoma con un gen mutado para que la actividad de la enzima pueda reducirse, incluido el caso en que se elimina la actividad de la proteína; un procedimiento para modificar la secuencia de regulación de la expresión del gen que codifica la proteína; un procedimiento de delección de parte o la totalidad de un gen que codifica la proteína en el cromosoma; un procedimiento para introducir un oligonucleótido antisentido (por ejemplo, ARN antisentido), que inhibe la traducción del ARNm a una proteína a través de una unión complementaria a la transcripción del gen en el cromosoma; un procedimiento para hacer imposible la unión del ribosoma formando una estructura secundaria agregando artificialmente una secuencia Shine-Dalgarno (SD) y su secuencia complementaria en el extremo frontal de la secuencia SD del gen que codifica la proteína; un procedimiento de ingeniería de transcripción inversa (RTE), que agrega un promotor para que se transcriba inversamente en el extremo terminal 3' del marco de lectura abierto (ORF) de la secuencia correspondiente, etc., y también incluye una combinación de los mismos, pero no están limitados a los mismos.

Específicamente, el procedimiento de delección de parte o la totalidad de un gen que codifica la proteína puede ejecutarse reemplazando el polinucleótido que codifica la proteína diana endógena dentro del cromosoma con un polinucleótido o un gen marcador que tiene una secuencia de ácido nucleico parcialmente delecionada, utilizando un vector para insertar cromosomas en bacterias. En una realización ejemplar, el gen puede ser delecionado por recombinación homóloga. Además, como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "parte", aunque puede variar dependiendo de los tipos de polinucleótidos, puede referirse específicamente a 1 nucleótido a 300 nucleótidos, más específicamente 1 nucleótido a 100 nucleótidos, e incluso más específicamente 1 nucleótido a 50 nucleótidos, pero no se limita a ello.

- Además, el procedimiento de modificación de la secuencia de regulación de la expresión se puede realizar induciendo una variación en la secuencia de regulación de la expresión mediante delección, inserción, sustitución conservativa, sustitución no conservativa, o una combinación de las mismas para debilitar aún más la actividad de la secuencia de regulación de la expresión; o reemplazando la secuencia con una secuencia de ácido nucleico que tiene una actividad más débil. La secuencia de regulación de la expresión incluye un promotor, una secuencia de operador, una secuencia que codifica el dominio de unión al ribosoma y una secuencia para regular la transcripción y la traducción.
- Además, el procedimiento para modificar la secuencia del gen se puede realizar induciendo una variación en la secuencia del gen mediante delección, inserción, sustitución conservativa, sustitución no conservativa, o una combinación de las mismas para debilitar aún más la actividad de la proteína; o reemplazando la secuencia con una secuencia de genes mejorada para tener una actividad más débil o una secuencia de genes mejorada para no tener actividad en absoluto.
- Además, el microorganismo productor de OPS puede ser uno en el que las actividades de la fosfoglicerato deshidrogenasa (*SerA*) o la fosfoserina aminotransferasa (*SerC*) se mejoran aún más en comparación con sus actividades endógenas.
- La *SerA* es una proteína capaz de convertir 3-fosfoglicerato en 3-fosfohidroxipiruvato, y para *SerA*, se puede usar un tipo salvaje o una variante, donde se elimina la retroalimentación sobre la serina. Además, la *SerC* es una proteína capaz de convertir 3-fosfohidroxipiruvato a OPS. Por consiguiente, cualquier microorganismo con actividades mejoradas de *SerA* y/o *SerC* se puede usar eficazmente como un microorganismo productor de OPS.
- La *SerA* puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 21 a 26, aunque no está limitada a las mismas. La SEQ ID NO: 21 es una secuencia de *SerA* de tipo salvaje, y las SEQ ID NO: 22 a 26 son secuencias de variantes donde se elimina la retroalimentación sobre la serina. Además, aquellas secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 80% de identidad de secuencia con los aminoácidos anteriores, específicamente al menos un 90%, más específicamente al menos un 95%, e incluso más específicamente al menos un 99% pueden incluirse siempre que exhiban las actividades de las variantes de *SerA* o de *SerA* de tipo salvaje en las que se elimina la retroalimentación sobre la serina, pero no se limitan a las mismas. Las variantes en las que se elimina la retroalimentación representan aquellas proteínas en las que se introduce una modificación en el gen que codifica *SerA* por inserción, sustitución, etc., lo que permite mantener la actividad de la inhibición por retroalimentación por serina o glicina, o que tienen actividades mejoradas de la misma, y aquellas variantes en las que se elimina la retroalimentación ya son bien conocidas (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; Patente Europea N.º EP0943687B).
- Además, la secuencia de polinucleótidos que codifica la *SerA* de tipo salvaje o las variantes, donde se elimina la retroalimentación sobre la serina, puede ser una secuencia de polinucleótidos que codifica cualquier secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 21 a 26, pero no se limita a las mismas. Debido a la degeneración del código genético o a la consideración de los codones preferidos por los organismos para expresar el polipéptido, se pueden ejecutar varias modificaciones en el polinucleótido en la región de codificación dentro del alcance sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido. La secuencia de polinucleótidos puede ser, por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de polinucleótidos representadas por las SEQ ID NO: 27 a 32, y puede tener una secuencia de nucleótidos que tenga una homología de al menos 80% con las secuencias de polinucleótidos, y específicamente al menos 90%, pero no se limita a ello.
- La *SerC* puede ser una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que, por ejemplo, está representada por la SEQ ID NO: 33, pero no está limitada a la misma. Además, la secuencia de aminoácidos, siempre que exhiba la actividad de *SerC*, también puede incluir secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80% con la secuencia de aminoácidos anterior, específicamente al menos 90%, más específicamente al menos 95%, e incluso más específicamente al menos 99%, pero no se limita a ello.
- Además, la secuencia de polinucleótidos que codifica la *SerC* puede ser la secuencia de polinucleótidos que codifica el aminoácido representado por la SEQ ID NO: 33. Debido a la degeneración del código genético o considerando los codones preferidos por los organismos para expresar el polipéptido, diversas modificaciones en el polinucleótido pueden ejecutarse en la región de codificación dentro del alcance sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido. La secuencia de polinucleótidos puede ser, por ejemplo, una representada por la SEQ ID NO: 34, y puede tener una secuencia de nucleótidos que tenga una homología de al menos 80% con las secuencias de polinucleótidos, y específicamente al menos 90%, pero no está limitada a las mismas.
- Además, el microorganismo puede ser uno en el que la capacidad de introducir o descomponer OPS en una célula se debilita aún más.

Con respecto a los contenidos en el microorganismo productor de OPS, la divulgación en la Patente Coreana N.º 1381048 o la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 2012-0190081 se puede usar como referencias de la presente invención, además de las descritas anteriormente.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir OPS, que incluye el cultivo de un microorganismo capaz de producir O-fosfoserina en la que una actividad de un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y es capaz de exportar O-fosfoserina, se mejora, en un medio; y separando O-fosfoserina del microorganismo capaz de producir O-fosfoserina, o el medio para la misma.

10 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "cultivo" se refiere al crecimiento del microorganismo en un entorno ajustado adecuadamente. El procedimiento de cultivo puede realizarse de acuerdo con el medio apropiado y las condiciones para el cultivo conocidas en la técnica. El procedimiento de cultivo se puede ajustar fácilmente para que lo use un experto en la técnica de acuerdo con la cepa a seleccionar. Específicamente, el cultivo puede ser un cultivo discontinuo, un cultivo continuo y un cultivo de extracción, pero no se limita a los mismos.

15 En el cultivo del microorganismo recombinante que tiene una actividad *SerB* reducida en comparación con su actividad endógena, el medio puede contener además glicina o serina, porque se induce el requerimiento 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 generalmente de 0,1 g/l a 10 g/l, y específicamente de 0,5 g/l a 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 generalmente de 0,1 g/l a 5 g/l, y específicamente de 0,1 g/l a 1 g/l.

20 Los ejemplos de la fuente de carbono que debe contener el medio pueden incluir carbohidratos y sacáridos 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 como el ácido acético. Estas fuentes de carbono se pueden usar solas o en combinación, pero no están limitadas a las mismas. Los ejemplos de la fuente de nitrógeno que debe contener el medio pueden incluir fuentes de nitrógeno orgánico como peptona, extracto de levadura, salsa, extracto de malta, licor de maíz (CSL) y harina de frijol; y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar solas o en combinación, pero no están limitadas a las mismas. Como fuente de fósforo, los medios de cultivo pueden incluir además fosfato de potasio dihidrogenado, fosfato de hidrógeno dipotásico y las correspondientes sales que contienen sodio, pero no se limitan a los mismos. Los medios de cultivo pueden incluir metales tales como sulfato de magnesio y sulfato de hierro. Además, se pueden incluir aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Estos medios de cultivo o precursores pueden agregarse al cultivo en forma de un cultivo discontinuo o un cultivo continuo, pero no están limitados a los mismos.

25 Además, el pH del cultivo puede ajustarse agregando un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico durante el cultivo de una manera apropiada. Además, se puede evitar la formación de burbujas durante el cultivo usando un agente antiespumante tal como el éster de poliglicol de ácido graso. Además, se puede agregar un gas de oxígeno o un gas que contiene un gas de oxígeno a un cultivo para mantener las condiciones aeróbicas en un líquido de cultivo; no se puede agregar aire para mantener condiciones anaerobias o condiciones microaerobias; o se puede inyectar gas nitrógeno, gas hidrógeno o dióxido de carbono. La temperatura de cultivo puede ser de 27 °C a 37 °C, y específicamente de 30 °C a 35 °C. El cultivo puede continuar hasta que se pueda obtener la producción del material deseado, y específicamente durante 10 horas a 100 horas.

30 En la presente invención, la OPS producida durante el cultivo puede separarse y purificarse adicionalmente. La OPS pretendida puede recuperarse del cultivo usando un procedimiento apropiado conocido en la técnica, de acuerdo con el procedimiento de cultivo, por ejemplo, un cultivo discontinuo, un cultivo continuo y un cultivo de extracción, pero no está limitado al mismo.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona usos de producción de OPS y exportación de OPS por medio del polipéptido, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

40 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento para producir cisteína o un derivado de la misma que incluye: a) producir O-fosfoserina (OPS) cultivando un microorganismo, en el que una actividad de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y es capaz de exportar O-fosfoserina se mejora en comparación con su actividad endógena, en un medio; y b) hacer reaccionar la O-fosfoserina (OPS) producida en a) o un cultivo que contiene la misma con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo capaz de expresar la misma.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "O-fosfoserina sulfhidrilasa" ("OPSS", en lo sucesivo) se refiere a un polipéptido 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 e 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 de tipo salvaje, sino también variantes que incluyen delección, sustitución o adición en parte de la secuencia de polinucleótidos que codifica la OPSS, que muestran una actividad igual o superior a la actividad biológica de la proteína OPSS de tipo salvaje, por ejemplo, e incluye las proteínas OPSS descritas en las Patentes Coreanas N.º 1381048 y 1208267 y sus variantes.

El sulfuro que se usará en la presente invención puede ser cualquier sulfuro proporcionado no solo en forma sólida generalmente usada en la técnica, sino también en forma líquida o gaseosa debido a la diferencia de pH, presión y solubilidad, y así 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 a usar en la presente invención puede ser  $Na_2S$ ,  $NaSH$ ,  $H_2S$ ,  $(NH_4)_2S$  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 sola cisteína o un derivado de la misma. En esta reacción, se agrega un sulfuro específicamente en una cantidad de 0,1 mol a 3 mol, y específicamente 1 mol a 2 mol por 1 mol de OPS.

Además, el procedimiento de la presente invención incluye además separar y purificar la cisteína producida en la reacción de la etapa b). En este caso, la cisteína deseada se puede recuperar aislándola y purificándola de la solución de reacción mediante una reacción adecuada conocida en la técnica.

Además, la presente invención se refiere a una producción de alto rendimiento de OPS obtenida potenciando la actividad del polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en un microorganismo productor de OPS, seguida de la reacción de la OPS producida con OPSS, produciendo así eficazmente cisteína. La cisteína así preparada se puede sintetizar en varios tipos de derivados de cisteína a través de una reacción de síntesis química conocida en la técnica modificando un átomo de hidrógeno o un grupo atómico particular.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "derivados" se refiere a compuestos similares obtenidos modificando químicamente una porción de cualquier compuesto. Usualmente, el término se refiere a compuestos en los cuales un átomo de hidrógeno o un grupo de átomos está sustituido con otro átomo de hidrógeno o grupo de átomos.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "derivados de cisteína" se refiere a compuestos en los que un átomo de hidrógeno o un grupo de átomos en la cisteína está sustituido 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 amina ( $-NH_2$ ) o el átomo de azufre del grupo tiol ( $-SH$ ) en la cisteína tiene otro átomo o grupo atómico unido al mismo. Los ejemplos de derivados de cisteína incluyen *N*-acetilcisteína (NAC), *S*-carboximetilcisteína (SCMC), Boc-Cys(Me)-OH, (R)-S-(2-amino-2-carboxietil)-L-homocisteína, ácido (R)-2-amino-3-sulfopropiónico, ácido D-2-amino-4-(etil) butírico, 3-sulfino-L-alanina, Fmoc-Cys(Boc-metil)-OH, seleno-L-cisteína, S-(2-tiazolil)-L-cisteína, S-(2-tienil)-L-cisteína, S-(4-tolil)-L-cisteína, pero no se limitan a los mismos. La cisteína se puede sintetizar fácilmente en *N*-acetilcisteína (NAC) por reacción con un agente de acetilación, y en condiciones básicas, se puede sintetizar en *S*-carboximetilcisteína (SCMC) mediante una reacción con un ácido haloacético. Estos derivados de cisteína se usan principalmente como materiales farmacéuticos para agentes antitusivos, agentes para aliviar la tos y agentes terapéuticos para bronquitis, asma bronquial, laringofaringitis, etc.

### Modo para la invención

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

#### Ejemplo 1: Identificación del transportador YhhS MFS y el transportador YegB MFS

Con el fin de identificar las proteínas de membrana de *Escherichia coli* implicadas en la exportación de OPS, se seleccionó una biblioteca de ADN genómico de *Escherichia coli* K12\_W3110 (ATCC27325).

Específicamente, con el fin de establecer las condiciones en las que la OPS inhibe el crecimiento de *E. coli*, se construyó una cepa de plataforma que produce OPS. La cepa de plataforma para la selección fue un microorganismo recombinante modificado para reducir la actividad de la fosfoserina fosfatasa endógena (*SerB*) en la cepa de *E. coli* de tipo salvaje W3110, y se designó como "KCCM11212P" (también llamada "CA07-0012"; Patente coreana N.º 10-1381048; Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 2012-0190081). Usando la cepa KCCM11212P productora de OPS, se establecieron condiciones óptimas de detección que muestran inhibición del crecimiento cultivando la KCCM11212P, que es una cepa productora de OPS, en un

medio que contiene OPS.

Luego, los plásmidos de la biblioteca genómica de *W3110* se transformaron en *CA07-0012* por electroporación (van der Rest et al. 1999), y se seleccionaron colonias que mostraban la eliminación de la inhibición del crecimiento en condiciones medias que contenían 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* involucradas en la eliminación de la inhibición del crecimiento en condiciones medias que contienen una cantidad excesiva de OPS.

Las dos proteínas de membrana de *E. coli* se identificaron como *yhhS* y *mdtD*, que codifican el transportador de la superfamilia del facilitador principal (MFS) *YhhS* (una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3) y el transportador *YegB* MFS (una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4), respectivamente (Pao SS, Paulsen IT, Saier MH (1998). "Major facilitator superfamily (Superfamilia del facilitador principal)". *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(1); 1-34. PMID: 9529885).

**Ejemplo 2: Construcción de vectores de sobreexpresión *yhhS* y *mdtD***

Con el fin de examinar si la capacidad de exportación de OPS se mejora cuando el transportador *YhhS* MFS y el transportador *YegB* MFS, que participan en la eliminación de la inhibición del crecimiento por OPS, se mejoran en las cepas productoras de OPS, los vectores que sobreexpresan cada uno de los genes fueron construidos. Además, dado que los presentes inventores confirmaron que la concentración de OPS aumentó cuando el transportador de homoserina/homoserina lactona *RhtB* se mejoró en la cepa productora de OPS (Patente Coreana N.º 138104), la cepa mejorada con *RhtB* se usó como control positivo. Además, también se evaluaron los transportadores de eflujo de múltiples fármacos *EmrD* e *YcaD* MFS que pertenecen a la superfamilia del facilitador principal (MFS), a la que pertenece *MacB*. De la misma manera que en *YhhS* y *MdtD*, también se evaluaron el transportador de eflujo múltiples fármacos *EmrD* y el transportador *YcaD* MFS, que son proteínas de membrana de *E. coli* que pertenecen a la superfamilia del facilitador principal (MFS). En este ejemplo, los fragmentos del gen *yhhS* (SEQ ID NO: 3, Números de Acceso: b3473) que codifican el transportador *YhhS* MFS y los fragmentos del gen *mdtD* (SEQ ID NO: 4, Números de Acceso: b2077) que codifican el transportador *YegB* MFS se obtuvieron mediante PCR usando el ADN genómico de *W3110* como plantilla.

En la Tabla 1 dada a continuación, se muestran las secuencias de cebadores usadas para construir vectores de sobreexpresión para cada uno de los genes para las proteínas de membrana.

**Tabla 1**

Gen	Cebador (5'→3')	SEQ ID NO	Vector
<i>yhhS</i>	GATATCATGCCCGAACCCGTAGC	5	<i>pCL-PrhtB-yhhS</i>
	AAGCTTTTAAGATGATGAGGCGGCCT	6	
<i>mdtD</i>	GATATCATGACAGATCTTCCCGACAGC	7	<i>pCL-PrhtB-mdtD</i>
	AAGCTTTCATTGCGCGCTCCTTT	8	
<i>rhtB</i>	GATATCATGACCTTAGAATGGTGG	9	<i>pCL-PrhtB-rhtB</i>
	AAGCTTTCACGCATGCCTCGCCGA	10	
<i>emrD</i>	GATATCATGAAAAGGCAAAGAAACGTCAA	11	<i>pCL-PrhtB-emrD</i>
	AAGCTTTTAAACGGGCTGCCCT	12	
<i>ycaD</i>	GATATCATGTCCACGTATACCCAGCCTG	13	<i>pCL-PrhtB-ycaD</i>
	AAGCTTTTACACGTGAGCAACGGGTTT	14	
<i>pCL-1920</i>	AAGCTTCGGGCCTCTTCGCTATTACGC	15	<i>pCL-PrhtB</i>
	AAGCTTAGGCTTACCCGTCTTACTGTC	16	

Específicamente, se realizó una reacción de PCR para *yhhS* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 5 y 6, mientras que se realizó una reacción de PCR para *mdtD* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 7 y 8. Los cebadores usados en las reacciones de PCR se construyeron con base 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.

Además, los fragmentos de los genes *rhtB*, *emrD* e *ycaD* se amplificaron mediante reacciones PCT usando los respectivos pares de cebadores que se muestran en la Tabla 1 dada a continuación.

Cada uno de los fragmentos de genes amplificados se trató con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII*, y se clonó en los sitios de enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII* del vector *pCL-PrhtB*, que incluye el promotor (PrhtB) del gen *E. coli* *rhtB* insertado en un vector *pCL1920* (GenBank N.º AB236930), construyendo así *pCL-PrhtB-rhtB*, *pCL-PrhtB-yhhS*, *pCL-PrhtB-mdtD*, *pCL-PrhtB-emrD* y *pCL-PrhtB-ycaD*, respectivamente.

**Ejemplo 3: Construcción de una cepa con transportador YhhS MFS mejorado y transportador YegB MFS y evaluación de la capacidad de producción de OPS**

**<Ejemplo 3-1: Construcción de una cepa con el transportador YhhS MFS mejorado y el transportador YegB MFS utilizando CA07-0012 y evaluación de la capacidad de producción de OPS>**

Cada uno de los cinco tipos de plásmidos construidos en el Ejemplo 2 se introdujo en la cepa *CA07-0012* productora de OPS, y luego se evaluaron las capacidades de producción de OPS de las cepas resultantes.

Específicamente, cada una de las cepas se sembró en un medio sólido LB y se cultivó durante una noche en una incubadora a 33 °C. Cada una de las cepas cultivadas durante la noche en el medio sólido LB se inoculó en un medio de titulación de 25 ml que se muestra en la Tabla 2 dada a continuación, y luego se incubó en una incubadora a 34,5 °C y 200 rpm durante 40 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 2**

Composición	Conc. (por cada 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 de calcio	30 g
pH	6,8

**Tabla 3**

Cepa	OD562nm	Consumo de glucosa (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0012	35	32	1,1
CA07-0012/ <i>pCL-PrhtB-rhtB</i>	40	35	1,3
CA07-0012/ <i>pCL-PrhtB-yhhS</i>	37	34	2,1
CA07-0012/ <i>pCL-PrhtB-mdtD</i>	41	32	1,8
CA07-0012/ <i>pCL-PrhtB-emrD</i>	38	34	1,2
CA07-0012/ <i>pCL-PrhtB-ycaD</i>	37	33	0,9

Como se muestra en la Tabla 3 anterior, entre los casos en los que los genes de la proteína de membrana de *E. coli* se introdujeron adicionalmente en la cepa *E. coli* CA07-0012, respectivamente, las cepas que tenían *rhtB*, *emrD* o *ycaD* mejoradas mostraron aumentos significativos en la producción de OPS, en comparación con la cepa *CA07-0012*, y en particular, las cepas que tienen *YhhS* y *MdtD* mejoradas mostraron un aumento de al menos 150% en la concentración de OPS. Por el contrario, las cepas que tenían *EmrD* e *YcaD* mejoradas, que se usaron como grupo experimental, no mostraron ningún aumento en la concentración de OPS.

La cepa designada como "*CA07-0012/pCL-PrhtB-yhhS*" fue nombrada como "*Escherichia coli* CA07-0266 (CA07-0266)" y depositada en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, reconocida como una autoridad internacional de depósito en virtud del Tratado de Budapest, el 9 de diciembre de 2013 con el número de acceso KCCM11495P.

Además, la cepa designada como "*CA07-0012/pCL-PrhtB-mdtD*" fue nombrada como "*Escherichia coli* CA07-0267 (CA07-0267)" y depositada en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, reconocida como autoridad internacional de depósito en virtud del Tratado de Budapest, el 9 de diciembre de 2013 con el número de acceso KCCM11496P.

**<Ejemplo 3-2: Construcción de una cepa con transportador YhhS MFS mejorado y transportador YegB MFS usando una cepa con SerA y SerC mejoradas y evaluación de la capacidad de producción de OPS>**

Además, se examinaron los efectos de los genes de la proteína de membrana de *E. coli* usando la cepa productora de OPS, CA07-0022/pCL-Prmf-SerA\*(G336V)-(RBS)SerC (Publicación de Solicitud de Patente Coreana N.º 10-2012-004111), en el que se mejoraron las actividades de D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA) y 3-fosfoserina aminotransferasa (SerC) como vías de biosíntesis de OPS. Los resultados se muestran en la Tabla 4 dada a continuación.

**Tabla 4**

Cepa	OD562nm	Consumo de glucosa (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0022/pCL-Prmf-SerA*(G336V)-(RBS)SerC	30	27	2,4
CA07-0022/pCL-Prmf-SerA*(G336V)-(RBS)SerC-PrhtB-rhtB	32	28	2,8
CA07-0022/pCL-Prmf-SerA*(G336V)-(RBS)SerC-PrhtB-yhhS	28	26	4,0
CA07-0022/pCL-Prmf-SerA*(G336V)-(RBS)SerC-PrhtB-mdtD	27	27	3,5
CA07-0022/pCL-Prmf-SerA*(G336V)-(RBS)SerC-PrhtB-emrD	33	29	2,3
CA07-0022/pCL-Prmf-SerA*(G336V)-(RBS)SerC-PrhtB-ycaD	34	28	1,9

Como se muestra en la Tabla 4 anterior, se confirmó de nuevo que, entre las cepas en las que los genes de la proteína de membrana de *E. coli* se introdujeron adicionalmente en la cepa CA07-0022/pCL-Prmf-SerA\*(G336V)-(RBS)SerC, las cepas que tienen YhhS y MdtD mejoradas de la presente invención y la cepa que tiene RhtB mejorado (control positivo) mostraron aumentos en la producción de OPS, en comparación con la cepa CA07-0012 derivada de *E. coli*. En particular, las cepas que tienen YhhS y MdtD mejorados de la presente invención mostraron un aumento de al menos 145% en la concentración de OPS, de manera similar a los resultados mostrados en la Tabla 3 anterior. Por el contrario, las cepas que tienen ErmD e YcaD mejoradas mostraron una disminución en la concentración de OPS, en relación con la del grupo de control.

**<Ejemplo 3-3: Construcción de una cepa con el transportador mejorado YhhS MFS y el transportador YegB MFS de acuerdo con la fuerza del promotor y evaluación de la capacidad de producción de OPS>**

Además, para examinar si la mejora de la fuerza del promotor puede aumentar la capacidad de exportación, las proteínas de membrana YhhS y MdtD con una concentración aumentada de OPS se compararon con el grupo de control, mediante la introducción adicional de genes *yhhS* y *mdtD* en CA07-0022/pCL-Prmf-SerA\*(G336V)-(RBS)SerC, utilizando un promotor *trc* (*P<sub>trc</sub>*), que es un promotor más fuerte que el promotor *rhtB* (*P<sub>rhtB</sub>*).

Cada uno de los fragmentos de genes *yhhS* y *mdtD* se trató con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII*, y se clonó en los sitios de enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII* del vector *pCL-P<sub>trc</sub>-GFP*, que incluye el promotor *trc* insertado en un vector *pCL1920*, construyendo así *pCL-P<sub>trc</sub>-yhhS* y *pCL-P<sub>trc</sub>-mdtD*, respectivamente. Luego, las reacciones de PCR se realizaron usando cada plásmido como plantilla junto con los pares de cebadores de la SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, y los resultantes se trataron con *HindIII* y luego se clonaron en el sitio de restricción *HindIII* de *pCL-Prmf-SerA\** (G336V)-(RBS)SerC.

**Tabla 5**

Cepa	OD562nm	Consumo de glucosa (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0022/pCL-Prmf-SerA*(G336V)-(RBS)SerC	31	30	2,7
CA07-0022/pCL-Prmf-SerA*(G336V)-(RBS)SerC-P <sub>trc</sub> -yhhS	28	33	5,5
CA07-0022/pCL-Prmf-SerA*(G336V)-(RBS)SerC-P <sub>trc</sub> -mdtD	29	31	4,3

Como resultado, como se muestra en la Tabla 5 anterior, cuando se aumentó la expresión de proteínas de membrana de *E. coli* al mejorar el promotor, hubo un aumento de rendimiento de al menos 150% en comparación con el grupo de control, y un aumento de al menos 120% en comparación con cuando se usó el promotor *rhtB*.

**<Ejemplo 3-4: Construcción de una cepa con el transportador YhhS MFS mejorado y el transportador YegB MFS de acuerdo con la fuerza del promotor en el cromosoma y evaluación de la capacidad de producción de OPS>**

- 5 Además, para examinar si el reemplazo de los promotores para los genes *yhhS* y *mdtD* con promotores más fuertes en el cromosoma puede mejorar la capacidad de exportación, la capacidad de producción de OPS se evaluó mediante la construcción de una cepa, donde el autopromotor fue reemplazado por el promotor *cj1* (Patente Coreana N.º 0620092). La introducción del promotor *cj1* en el cromosoma de *E. coli* se ejecutó mediante un procedimiento convencional como se describe a continuación. Para el reemplazo de autopromotores de *yhhS* y *mdtD* en el cromosoma, el vector recombinante construido se transformó en una cepa productora de OPS, CA07-0022/pCL-Prmf-SerA\*(G336V)-(RBS)SerC (Patente Coreana N.º 138104), y la secuencia promotora anterior en el vector y las secuencias autopromotoras se reemplazaron mediante recombinación homóloga, y de ese modo la secuencia promotora *cj1* se insertó en el cromosoma.
- 10
- 15 Cada cepa se colocó en un medio sólido LB y se cultivó durante una noche en una incubadora a 33 °C. Cada una de las cepas cultivadas durante la noche en el medio sólido LB se inoculó en un medio de titulación de 25 ml que se muestra en la Tabla 2 anterior, y luego se incubó en una incubadora a 34,5 °C y 200 rpm durante 40 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 6 dada a continuación.

20 **Tabla 6**

Cepa	OD562nm	Consumo de glucosa (g/l)	O-fosfoserina (g/l)
CA07-0022/pCL-Prmf-SerA*(G336V)-(RBS)SerC	30	29	2,7
CA07-0022::Pcj1 yhhS/pCL-Prmf-SerA* (G336V)-(RBS)SerC	28	30	3,5
CA07-0022::Pcj1 mdtD/pCL-Prmf-SerA* (G336V)-(RBS)SerC	29	31	3,2

- 25
- 30 Como se muestra en la Tabla 6 anterior, cuando se aumentó la expresión de cada proteína de membrana en el cromosoma, el rendimiento relativo al del grupo de control se incrementó hasta en un 130%.

**Ejemplo 4: Confirmación de la función de exportación de OPS del transportador YhhS MFS y el transportador YegB MFS**

- 35 Entre las muestras en matraces, en las que se confirmó la producción de OPS en el Ejemplo 3, después de eliminar todas las OPS exportadas en el medio usando CA07-0022/pCL-Prmf-SerA\*(G336V)-(RBS)SerC, que es un control negativo donde las proteínas de membrana no se mejoraron, y las muestras CA07-0022/pCL-Prmf-SerA\*(G336V)-(RBS)SerC-Ptrc-yhhS y CA07-0022/pCL-Prmf-SerA\*(G336V)-(RBS)SerC-Ptrc-mdtD, en el que se mejoraron las proteínas de membrana YhhS y MdtD, solo se recogieron las células y se trituraron las células. La concentración de OPS dentro de la célula se midió por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y los resultados se muestran en la Figura 1.
- 40

- 45 Como resultado, como se muestra en la Figura 1, las cepas con YhhS y MdtD mejoradas de la presente invención mostraron una disminución en la concentración intracelular de OPS en un 30% a 40%, en comparación con la del grupo control, confirmando así que las proteínas YhhS y MdtD juegan un papel en la exportación de OPS a fuera de la célula. Por consiguiente, se confirmó que la mejora de las proteínas YhhS y MdtD puede exportar sin problemas OPS en la célula al exterior, mejorando así la capacidad de producción de OPS.

50 <110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Microorganismo productor de O-fosfoserina y procedimiento de producción de O-fosfoserina o L-cisteína mediante el uso del mismo

55 <130> OPA15193

<150> KR 10-2014-0104670

<151> 2014-08-12

60 <160> 34

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

65 <211> 405

ES 2 753 413 T3

<212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1).. (405)  
 <223> YhhS Transportador MFS, YhhS

<400> 1

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

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

ES 2 753 413 T3

		195				200				205						
	Lys	Pro	Leu	Pro	Phe	Arg	Ala	Val	Leu	Gly	Arg	Val	Trp	Leu	Tyr	Gly
5		210					215					220				
	Met	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ser	Ala	Gly	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe
	225					230					235					240
10	Ile	Thr	Leu	Phe	Tyr	Asp	Ala	Lys	Gly	Trp	Asp	Gly	Ala	Ala	Phe	Ala
					245					250					255	
	Leu	Thr	Leu	Phe	Ser	Cys	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Arg	Leu	Leu	Phe	Pro
				260					265					270		
15	Asn	Gly	Ile	Asn	Arg	Ile	Gly	Gly	Leu	Asn	Val	Ala	Met	Ile	Cys	Phe
			275					280					285			
20	Ser	Val	Glu	Ile	Ile	Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Gly	Val	Ala	Thr	Met	Pro
		290					295					300				
	Trp	Met	Ala	Lys	Ile	Gly	Val	Leu	Leu	Ala	Gly	Ala	Gly	Phe	Ser	Leu
	305					310					315					320
25	Val	Phe	Pro	Ala	Leu	Gly	Val	Val	Ala	Val	Lys	Ala	Val	Pro	Gln	Gln
					325					330					335	
30	Asn	Gln	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Thr	Tyr	Thr	Val	Phe	Met	Asp	Leu	Ser
				340					345					350		
	Leu	Gly	Val	Thr	Gly	Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Val	Met	Ser	Trp	Ala	Gly
			355				360						365			
35	Val	Pro	Val	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Ala	Ile	Ala	Leu
		370					375					380				
40	Leu	Leu	Thr	Trp	Arg	Leu	Lys	Lys	Arg	Pro	Pro	Glu	His	Val	Pro	Glu
						390					395					400
	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser											
					405											
45	<210> 2															
	<211> 471															
	<212> PRT															
	<213> Escherichia coli															
50	<220>															
	<221> PÉPTIDO															
	<222> (1).. (471)															
	<223> Transportador YegB MFS, MdtD															
55	<400> 2															
	Met	Thr	Asp	Leu	Pro	Asp	Ser	Thr	Arg	Trp	Gln	Leu	Trp	Ile	Val	Ala
	1				5					10					15	
60	Phe	Gly	Phe	Phe	Met	Gln	Ser	Leu	Asp	Thr	Thr	Ile	Val	Asn	Thr	Ala
				20					25					30		
	Leu	Pro	Ser	Met	Ala	Gln	Ser	Leu	Gly	Glu	Ser	Pro	Leu	His	Met	His
			35					40					45			
65																

ES 2 753 413 T3

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

ES 2 753 413 T3

	Asn	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Asn	Ser	Leu	Leu	Ser	Met	Ile	Met	Gln	Leu	
	385					390					395				400		
5	Ser	Met	Ser	Ile	Gly	Val	Thr	Ile	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Phe	
					405					410					415		
	Gly	Ser	Gln	His	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Gly	Thr	Thr	Gln	Thr	Val	Phe	
				420					425					430			
10	Met	Tyr	Thr	Trp	Leu	Ser	Met	Ala	Leu	Ile	Ile	Ala	Leu	Pro	Ala	Phe	
			435					440					445				
	Ile	Phe	Ala	Arg	Val	Pro	Asn	Asp	Thr	His	Gln	Asn	Val	Ala	Ile	Ser	
15		450					455					460					
	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Ala	Gln										
	465					470											
20	<210>	3															
	<211>	1218															
	<212>	ADN															
	<213>	Escherichia coli															
25	<220>																
	<221>	gen															
	<222>	(1)..(1218)															
	<223>	yhhS															
30	<400>	3															
	atgcccgaa	ccgtagccga	accgcgcta	aacggattgc	gcctgaattt	gcgcattgtc										60	
	tctatagtca	tgtttaactt	cgccagctac	ctcaccatcg	ggttgccgct	cgctgtatta										120	
35	ccgggctatg	tccatgatgt	gatgggcttt	agcgccttct	gggcaggatt	ggttatcagc										180	
	ctgcaatatt	tcgccacctt	gctgagccgc	cctcatgccg	gacgttacgc	cgattogctg										240	
40	ggacccaaaa	agattgtcgt	cttcggttta	tgcggctgct	ttttgagcgg	tctgggggat										300	
	ctgacggcag	gattaaccgc	cagtctgcct	gtcatcagcc	tgttattact	ttgcctgggg										360	
	cgcgatcatc	ttgggattgg	gcaaagtttt	gccggaacgg	gatcgaccct	atggggcggt										420	
45	ggcgtgggtg	gctcgtgca	tatcgggcgg	gtgatttcgt	ggaacggcat	tgctcacttac										480	
	ggggcgatgg	cgatgggtgc	gccgttaggc	gtcgtgtttt	atcactgggg	cggttgacag										540	
50	gcgttagcgt	taatcattat	gggcgtggcg	ctgggtggcca	ttttgttggc	gatcccgcgt										600	
	ccgacggtaa	aagccagtaa	aggcaaaccg	ctgccgtttc	gcgcggtgct	tgggcgcgtc										660	
	tggctgtacg	gtatggcgct	ggcactggct	tccgcgggat	ttggcgtcat	cgccaccttt										720	
55	atcacgctgt	tttatgacgc	taaaggttgg	gacggtgcgg	ctttcgcgct	gacgctgttt										780	
	agctgtgcgt	ttgtcggtag	gcgtttgta	ttccctaacg	gcattaaccg	tatcggtagc										840	
60	ttaaacgtag	cgatgatttg	ctttagcgtt	gagataatcg	gcctgctact	ggttggcgtg										900	
	gcgactatgc	cgtggatggc	gaaaatcggc	gtcttactgg	cgggggccgg	gttttcgctg										960	
65																	

ES 2 753 413 T3

	gtgttcccgg cattgggtgt agtggcggta aaagcggttc cgcagcaaaa tcagggggcg	1020
	gcgctggcaa cttacaccgt atttatggat ttatcgcttg gcgtgactgg accactggct	1080
5	gggctgggtga tgagctgggc gggcgtaccg gtgatttata tggcggcggc gggactggtc	1140
	gcaatcgcgt tattactgac gtggcgatta aaaaaacggc ctccggaaca cgtccctgag	1200
10	gccgcctcat catcttaa	1218
	<210> 4 <211> 1416 <212> ADN <213> Escherichia coli	
15	<220> <221> gen <222> (1).. (1416) <223> mdtD	
20	<400> 4	
	atgacagatc ttcccgacag cacccgttgg caattgtgga ttgtggcttt cggettcttt	60
25	atgcagtcgc tggacaccac catcgtaaac accgcccttc cctcaatggc gcaaagcctc	120
	ggggaaagtc cgttgcatat gcacatggtc attgtctctt atgtgctgac cgtggcggtg	180
30	atgctgcccg ccagcggctg gctggcggac aaagtcggcg tgcgcaatat tttctttacc	240
	gccatcgtgc tgtttactct cggttcactg ttttgcggc tttccggcac gctgaacgaa	300
	ctgttgctgg cacgcgcggt acagggcggt ggcggcgcga tgatggtgcc ggtcggcaga	360
35	ttgacgggtga tgaaaatcgt accgcgcgag caatatatgg cggcgatgac ctttgtcacg	420
	ttaccgggtc aggtcgggtcc gctgctcggc ccggcgcctcg gcggctctgct ggtggagtac	480
40	gcatcgtggc actggatctt tttgatcaac attccggctg ggattatcgg tgcgatcgcc	540
	acattgctgt taatgccgaa ctacaccatg cagacgcggc gctttgatct ctccggattt	600
	ttattgctgg cggttggcat ggcggtatta accctggcgc tggacggcag taaaggtaca	660
45	ggtttatcgc cgctgacgat tgcaggcctg gtcgcagttg gcgtggtggc actggtgctt	720
	tatctgctgc acgccagaaa taacaaccgt gccctgttca gtctgaaact gttccgtact	780
50	cgtacctttt cgctgggcct ggcgggggagc tttgccggac gtattggcag tggcatggtg	840
	ccctttatga caccggtttt cctgcaaatt ggcctcgggt tctcgcctgt tcatgccgga	900
	ctgatgatga tcccgatggt gcttggcagc atgggaatga agcgaattgt ggtacaggtg	960
55	gtgaatcgcct ttggttatcg tcgggtactg gtagcgacca cgctgggtct gtcgctggtc	1020
	accctgttgt ttatgactac cgccctgctg ggctgggtact acgttttgcc gttcgtcctg	1080
60	tttttacaag ggatggtcaa ctcgacgcgt ttctcctcca tgaacaccct gacgctgaaa	1140
	gatctcccgg acaatctggc gagcagcggc aacagcctgc tgtcgatgat tatgcaattg	1200
65		

ES 2 753 413 T3

	tcgatgagta tcggcgtcac tategccggg ctggttgetgg gactttttgg ttcacagcat	1260
	gtcagcgtcg acagcggcac cacacaaacc gtctttatgt acacctggct tagcatggcg	1320
5	ttgatcatcg cccttcgggc gttcatcttt gccagagtgc cgaacgatac gcatcaaaat	1380
	gtagctattdt cgcggcgaaa aaggagcgcg caatga	1416
10	<210> 5 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador para la amplificación de yhhS para construir pCL-PrhtB-yhhS	
	<400> 5 gatatcatgc ccgaaccggt agc	23
20	<210> 6 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador para la amplificación de yhhS para construir pCL-PrhtB-yhhS	
	<400> 6 aagctttaa gatgatgagg cggcct	26
30	<210> 7 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador para la amplificación de mdtD para construir pCL-PrhtB-mdtD	
	<400> 7 gatatcatga cagatctcc cgacagc	27
40	<210> 8 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador para la amplificación de mdtD para construir pCL-PrhtB-mdtD	
	<400> 8 aagcttcat tgcgcgctcc ttt	23
50	<210> 9 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador para la amplificación de rhtB para construir pCL-PrhtB-rhtB	
	<400> 9 gatatcatga ccttagaatg gtgg	24
60	<210> 10 <211> 24	
65		

# ES 2 753 413 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <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

15 <220>  
<223> cebador para la amplificación de emrD para construir pCL-PrhtB-emrD

<400> 11  
gatatcatga aaaggcaaag aaacgtcaa 29

20 <210> 12  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> cebador para la amplificación de emrD para construir pCL-PrhtB-emrD

<400> 12  
30 aagcttttaa acgggctgcc cct 23

<210> 13  
<211> 28  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la amplificación de ycaD para construir pCL-PrhtB-ycaD

40 <400> 13  
gatatcatgt ccacgtatac ccagcctg 28

<210> 14  
<211> 27  
45 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador para la amplificación de ycaD para construir pCL-PrhtB-ycaD

50 <400> 14  
aagcttttac acgtgagcaa cgggttt 27

<210> 15  
<211> 27  
55 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
60 <223> cebador para la amplificación de genes pCL-PrhtB para construir genes pCL-Prmf-serA (G336V) -  
serC\_PrhtB

<400> 15  
65 aagcttcggg cctctcgct attacgc 27

ES 2 753 413 T3

<210> 16  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> cebador para la amplificación de genes pCL-PrhtB para construir genes pCL-Prmf-serA (G336V) - serC\_PrhtB

10

<400> 16  
 aagcttaggc ttaccgtct tactgtc 27

15

<210> 17  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1).. (446)  
 <223> fosfoserina fosfatasa, SerB

<400> 17

25

Met Ser Cys Ser Ala Leu Arg His Glu Thr Ile Val Ala Val Thr Glu  
 1 5 10 15

30

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

35

Gly Lys Asp Arg Pro Gly Val Thr Ala Ala Phe Phe Arg Val Leu Ser

40

45

50

55

60

65

ES 2 753 413 T3

	50					55						60					
	Ala	Asn	Gln	Val	Gln	Val	Leu	Asp	Val	Glu	Gln	Ser	Met	Phe	Arg	Gly	
	65					70					75					80	
5		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	
10				100					105					110			
	Val	Val	Val	Glu	Leu	Gln	Glu	Thr	Val	Gln	Ser	Ser	Arg	Pro	Arg	Ser	
			115					120					125				
15	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	
20	145					150					155					160	
	Ile	Arg	Gly	Ile	Ser	Asp	Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Leu	Glu	Leu	Lys	Val	
					165						170					175	
25	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				
30	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	
35	225					230					235					240	
	Gly	Lys	Glu	Ala	Glu	Val	Ala	Ala	Val	Thr	Glu	Arg	Ala	Met	Arg	Gly	
					245					250					255		
40	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	
45			275					280					285				
	Thr	Pro	Gly	Ala	Arg	Thr	Thr	Ile	Arg	Thr	Leu	Asn	Arg	Met	Gly	Tyr	
	290						295					300					
50	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		
55	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	
60			355					360					365				
	Lys	Met	Tyr	Gln	Thr	Val	Ala	Val	Gly	Asp	Gly	Ala	Asn	Asp	Ile	Asp	
	370						375					380					
65	Met	Leu	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Val	Ala	Phe	Asn	Ala	Lys	Pro	Ala	



ES 2 753 413 T3

	195		200		205																
	Phe	Phe	Ala	Glu	Tyr	Leu	Arg	Asp	Lys	Leu	Arg	Leu	Thr	Ala	Val	Val					
		210					215					220									
5																					
	Ala	Asn	Glu	Leu	Glu	Ile	Met	Asp	Gly	Lys	Phe	Thr	Gly	Asn	Val	Ile					
	225					230					235					240					
10	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							
15																					
	Gly	Ala	Asn	Asp	Leu	Pro	Met	Ile	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Ile	Ala					
			275					280					285								
20	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					
25																					
	Gln	Lys																			
	<210>	19																			
	<211>	1341																			
	<212>	ADN																			
30	<213>	Corynebacterium glutamicum																			
	<220>																				
	<221>	gen																			
	<222>	(1).. (1341)																			
35	<223>	fosfoserina fosfatasa, SerB																			
	<400>	19																			
40	atgtcgtggt	ccgcgctcag	acatgagaca	attggtgccg	tgactgaact	catccagaat															60
	gaatcccaag	aaatcgctga	gctggaagcc	ggccagcagg	ttgcattgcg	tgaaggttat															120
	cttcctgctg	tgatcacagt	gagcggtaaa	gaccgcccag	gtgtgactgc	cgcgttcttt															180
45	agggctctgt	ccgctaataca	ggttcaggtc	ttggacgttg	agcagtcaat	gttccgtggc															240
	tttttgaact	tggcggcggt	tgtgggtatc	gcacctgagc	gtgtcgagac	cgtcaccaca															300
	ggcctgactg	acaccctcaa	gggtcatgga	cagtccgtgg	tggaggagct	gcaggaaact															360
50	gtgcagtcgt	cccgtcctcg	ttcttcccat	gttgttggtg	tgttggtgga	tccggttgat															420
	gcggttgata	tttcccgcag	tggtcagacc	ctggcggatt	acgatgcca	cattgacacc															480
55	attcgtggta	tttcggatta	ccctgtgacc	ggcctggagc	tgaaggtgac	tgtgccggat															540
	gtcagccctg	gtggtggtga	agcgatgcgt	aaggcgcttg	ctgctcttac	ctctgagctg															600
60	aatgtggata	ttgcgattga	gcgcttctgt	ttgctgcgtc	gttctaagcg	tctgggtgtgc															660
	ttcgattgtg	attccacggt	gatcactggt	gaggtcattg	agatgctggc	ggctcacgcg															720
65																					

ES 2 753 413 T3

ggcaaggaag ctgaagttgc ggcagttact gagcgtgcga tgcgcggtga gctcgatttc 780  
 gaggagtctc tgcgtgagcg tgtgaaggcg ttggctgggt tggatgcgtc ggtgatcgat 840  
 5 gaggtcgctg ccgctattga gctgaccctt ggtgcgcgca ccacgatccg tacgctgaac 900  
 cgcatgggtt accagaccgc tgttgtttcc ggtggtttca tccaggtggt ggaaggtttg 960  
 gctgaggagt tggagttgga ttatgtccgc gccaacactt tggaaatcgt tgatggcaag 1020  
 10 ctgaccggca acgtcaccgg aaagatcgtt gaccgcgctg cgaaggctga gttcctccgt 1080  
 gagttcgctg cggattctgg cctgaagatg taccagactg tcgctgtcgg tgatggcgct 1140  
 15 aatgacatcg atatgctctc cgctgcgggt ctgggtggtt ctttcaacgc gaagcctgcg 1200  
 ctgaaggaga ttgcggatac ttccgtgaac caccattcc tcgacgaggt tttgcacatc 1260  
 atgggcattt cccgcgacga gatcgatctg gcggatcagg aagacggcac tttccaccgc 1320  
 20 gttccattga ccaatgccta a 1341  
 <210> 20  
 <211> 969  
 25 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli  
 <220>  
 <221> gen  
 30 <222> (1).. (969)  
 <223> fosfoserina fosfatasa, SerB  
 <400> 20  
 35 atgcctaaca ttacctggtg cgacctgcct gaagatgtct ctttatggcc ggtctgcct 60  
 ctttcattaa gtggtgatga agtgatgcc ctggattacc acgcaggtcg tagcggctgg 120  
 ctgctgatag gtcgtgggct ggataaaca cgtctgacct aataccagag caaactgggt 180  
 40 gcggcgatgg tgattgttgc cgcctggtgc gtggaagatt atcaggtgat tcgtctggca 240  
 ggttcactca ccgcacgggc tacacgcctg gccacgaag cgcagctgga tgcgccccg 300  
 45 ctggggaaaa tcccgcacct gcgcacgccg ggtttgctgg tgatggatat ggactccacc 360  
 gccatccaga ttgaatgtat tgatgaaatt gccaaactgg ccggaacggg cgagatggtg 420  
 gcggaagtaa ccgaacgggc gatgcgcggc gaactcgatt ttaccgccag cctgcgcagc 480  
 50 cgtgtggcga cgctgaaagg cgctgacgcc aatattctgc aacaggtgcy tgaaaatctg 540  
 ccgctgatgc caggcttaac gcaactggtg ctcaagctgg aaacgctggg ctggaaagtg 600  
 55 gcgattgcct ccggcggctt tactttcttt gctgaatacc tgcgcgacaa gctgcgcctg 660  
 accgccgtgg tagccaatga actggagatc atggacggta aatttaccgg caatgtgatc 720  
 60 ggcgacatcg tagacgcgca gtacaaagcg aaaactctga ctgcctcgc gcaggagtat 780  
 gaaatcccgc tggcgcagac cgtggcgatt ggcgatggag ccaatgacct gccgatgatc 840

65

ES 2 753 413 T3

```

aaagcggcag ggctggggat tgcctacat gccaaagccaa aagtgaatga aaagcgggaa          900
gtcaccatcc gtcacgctga cctgatgggg gtattctgca tcctctcagg cagcctgaat          960
5   cagaagtaa                                                                    969

<210> 21
<211> 410
<212> PRT
10  <213> Escherichia coli

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(410)
15  <223> SerA

<400> 21
20  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

25  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

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

35  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

40  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

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

50  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

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

60  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

65

```

ES 2 753 413 T3

Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys  
 245 250 255  
 5 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  
 10 Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile  
 290 295 300  
 15 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 Gly  
 325 330 335  
 20 Gly Arg Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr  
 340 345 350  
 25 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  
 30 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  
 35 <210> 22  
 <211> 530  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (E235K), SerA (E235K)  
 <400> 22  
 45 Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala  
 1 5 10 15  
 50 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  
 55 Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala  
 50 55 60  
 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  
 65

ES 2 753 413 T3

	Ala	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	His	Ser	Ala	Cys	Glu	His	Ala	Ile	Ser	Leu
				100					105					110		
5	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				
10	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
15					165					170					175	
	Ala	Asn	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Gln	Leu	Asn	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Leu
				180					185					190		
20	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
25		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
30					245					250					255	
	Gly	Phe	Asp	Val	Tyr	Ser	Thr	Glu	Pro	Cys	Thr	Asp	Ser	Pro	Leu	Phe
35				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
40		290					295					300				
	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	Phe	Val	Ala	Asp	Ala	Val	Asn	Val	Ser	Gly	Gly
	305					310					315					320
45	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
50				340					345					350		
	Val	Glu	Ala	Arg	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Glu	Gln	Val	Asp	Ala	Leu	Gly
			355					360					365			
55	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
60					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
65				420					425					430		

ES 2 753 413 T3

Leu Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg  
 435 440 445  
 5 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  
 10 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  
 15 500 505 510  
 Glu Ala Glu Ile Asn Ala Glu Leu Gly Ala Thr Ser Phe Gln Val Asp  
 515 520 525  
 20 Leu Asp  
 530  
 <210> 23  
 <211> 333  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (197 delta), SerA (197 delta)  
 30 <400> 23  
 Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala  
 1 5 10 15  
 35 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  
 40 35 40 45  
 Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala  
 50 55 60  
 45 Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp  
 65 70 75 80  
 50 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  
 55 Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg  
 115 120 125  
 60 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  
 65 Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr

ES 2 753 413 T3

				165					170				175			
	Ala	Asn	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Gln	Leu	Asn	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Leu
				180					185				190			
5	Asp	Glu	Leu	Met	Ser	Arg	Ser	Asp	Phe	Val	Thr	Ile	His	Leu	Pro	Lys
			195					200					205			
10	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
15	Glu	Gln	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Ile	Glu	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Gly	Ala
					245					250					255	
20	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			
25	Glu	Ala	Gln	Asp	Arg	Ala	Gly	Thr	Asp	Val	Ala	Asp	Ser	Val	Leu	Lys
		290					295					300				
30	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						
35	<210> 24															
	<211> 410															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
40	<220>															
	<223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (G336V), SerA (G336V)															
	<400> 24															
45	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		
50	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
55		50					55					60				
	Leu	Thr	Glu	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Ala	Glu	Lys	Leu	Val	Ala	Ile	Gly
	65					70					75					80
60	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
65				100					105					110		

ES 2 753 413 T3

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

5 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

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

15 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

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

25 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

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

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

40 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

45 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

50 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

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

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

<210> 25  
<211> 410  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

65

ES 2 753 413 T3

<220>

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

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 413 T3

Gly Leu Glu Val Ala Gly Lys Leu Ile Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser  
 305 310 315 320  
 5 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  
 10 Ala Leu Asn Lys Ile Phe Ala Glu Gln Gly Val Asn Ile Ala Ala Gln  
 355 360 365  
 15 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  
 20 Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr  
 405 410  
 <210> 26  
 <211> 410  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (G336V, R338G), SerA (G336V, R338G)  
 30 <400> 26  
 Met Ala Lys Val Ser Leu Glu Lys Asp Lys Ile Lys Phe Leu Leu Val  
 1 5 10 15  
 35 Glu Gly Val His Gln Lys Ala Leu Glu Ser Leu Arg Ala Ala Gly Tyr  
 20 25 30  
 40 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  
 45 Leu Thr Glu Asp Val Ile Asn Ala Ala Glu Lys Leu Val Ala Ile Gly  
 65 70 75 80  
 50 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  
 55 Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Val Pro  
 115 120 125  
 60 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  
 65

ES 2 753 413 T3

His Ile Gly Thr Gln Leu Gly Ile Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met Tyr  
 165 170 175  
 5 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  
 10 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  
 15 225 230 235 240  
 Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Asp Ala Leu Ala Ser Lys  
 245 250 255  
 20 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  
 25 275 280 285  
 Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Gln Glu Ala Gln Glu Asn Ile  
 290 295 300  
 30 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  
 35 325 330 335  
 Gly Gly Arg Leu Met His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val Leu Thr  
 340 345 350  
 40 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  
 45 Ala Asp Glu Asp Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Ala Met Lys Ala Ile  
 385 390 395 400  
 50 Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr  
 405 410

<210> 27  
 <211> 1233  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli

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

<400> 27

atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac

60

65

ES 2 753 413 T3

	caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc	120
	gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga	180
5	tcccgtaccc atctgactga agacgtgatc aacgccgcag aaaaactggc cgctattggc	240
	tgtttctgta tcggaacaaa ccagggtgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg	300
10	gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctggtgcgg agctggtgat tggcgaactg	360
	ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac	420
	aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt	480
15	catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat	540
	gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg	600
20	ctgaatatga gcgatgtggg gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg	660
	atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc	720
	ggtagtctgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaca tctggcgggg	780
25	gcggaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg	840
	ctgtgtgaat tcgacaacgt ctttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg	900
30	caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca	960
	acgctctctg cgggtgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacggtgg gcgtcgtctg	1020
	atgcacatcc acgaaaaccg tccgggcgtg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag	1080
35	cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt	1140
	attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt	1200
40	ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa	1233
	<210> 28	
	<211> 1593	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (E235K), SerA (E235K)	
	<400> 28	
50	atgagccaga atggccgtcc ggtagtcctc atcgccgata agcttgcgca gtccactggt	60
	gacgcgcttg gagatgcagt agaagtccgt tgggttgacg gacctaaccg cccagaactg	120
55	cttgatgcag ttaaggaagc ggacgcactg ctcgtgcggt ctgctaccac tgtcgatgct	180
	gaagtcacg ccgctgcccc taacttgaag atcgtcggtc gtgccggcgt gggcttgac	240
60	aacgttgaca tccctgctgc cactgaagct ggcgtcatgg ttgctaacgc accgacctct	300
	aatattcact ccgcttgtga gcacgcaatt tctttgctgc tgtctactgc tcgccagatc	360

65

ES 2 753 413 T3

	cctgctgctg atgcgacgct gcgtgagggc gagtggaagc ggtcttcttt caacgggtgtg	420
	gaaatthttcg gaaaaactgt cggatcgtc ggtthttggcc acattggtca gttgthttgct	480
5	cagcgtcttg ctgcgthttga gaccaccatt gttgcttacg atccttacgc taaccctgct	540
	cgtgcggctc agctgaacgt tgagttggtt gagttggatg agctgatgag ccgttctgac	600
10	thttgtcacca thcaccttcc taagaccaag gaaactgctg gcatgthttga tgcgcagctc	660
	cttgctaagt ccaagaaggg ccagatcatc atcaacgctg ctctgtggtg ccttgthtgat	720
	gagcaggctt tggctgatgc gattgagtcc ggtcacattc gtggcgctgg thttcgatgtg	780
15	tactccaccg agccttgcac tgattctcct thgttcaagt tgcctcaggt tgttgthgact	840
	cctcacttggt gtgcttctac tgaagaggct caggatcgtg cgggtactga cgttgctgat	900
20	tctgtgctca aggcgctggc tggcgagttc gtggcggatg ctgtgaacgt thccggthgg	960
	cgctgthggcg aaaagthtgc tgtgtggatg gatctggctc gcaagcttggt thttcttgct	1020
	ggcaagcttg tgcagccgc cccagthctc attgagthtgg aggctcgagg cgagctthtct	1080
25	thccgagcagg thgatgcact tggthttgtcc gctgthctgtg gthttgthctc cggaattatc	1140
	gaagagthccg thactthtct caacgthctc cgcattgctg aagagcgtgg cctggacatc	1200
30	thccgtgaaga ccaactctga gtctgthact caccgthctc thctgcaggt caagthcatt	1260
	actggcagcg ggcgcagcgc aactgthtgtt ggtgthctga ctggtcttga ggcgthtgag	1320
	aagatcaccg gcatcaatgg ccgtggcctg gatctgcgcg cagagthtct gaacctctc	1380
35	ctgcagtaca ctgacgctcc tggthgactg ggtaccgtht gtaccaagct gggthgctgct	1440
	ggcatcaaca thcaggtgctc tgcgthgact caggctgaga aggthgacgg cgctgthctg	1500
40	atcctgcgtg thgagthcgc thtctctgaa gagctggaag ctgaaatcaa cgctgagtht	1560
	ggtgctactt cctthccaggt thgatctgac taa	1593
45	<210> 29 <211> 1002 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (197 delta), SerA (197 delta)	
	<400> 29	
	atgagccaga atggcctcc ggtagthctc atcgccgata agctthgcgca thccactgth	60
55	gacgcgcttg gagatgcagt agaagthcctg tgggthgacg gacctaacgg cccagaactg	120
	cttgatgcag thaaaggaagc ggacgcactg ctctgthcgtt ctgctaccac thtctgatgct	180
	gaagthcatcg ccgthgccc thactthgaag atcgtcggth gtgcccggcgt gggctthggac	240
60	aacgthtgaca thcctgctgc cactgaagct ggcgthcatgg thgctaacgc accgacctct	300
65		

ES 2 753 413 T3

	aatattcact ccgcttgtga gcacgcaatt tctttgctgc tgtctactgc tcgccagatc	360
	cctgctgctg atgcgacgct gcgtgagggc gagtggaagc ggtcttcttt caacgggtgtg	420
5	gaaatthtcg gaaaaactgt cggatcgtc ggttttggcc acattggtca gttgtttgct	480
	cagcgtcttg ctgcgtttga gaccaccatt gttgcttacg atccttacgc taaccctgct	540
10	cgtgcggctc agctgaacgt tgagttggtt gagttggatg agctgatgag ccgttctgac	600
	tttgtcacca ttcaccttcc taagaccaag gaaactgctg gcatgthtga tgcgcagctc	660
	cttgctaagt ccaagaaggc ccagatcatc atcaacgctg ctctgtggtg ccttgthtga	720
15	gagcaggctt tggctgatgc gattgagtcc ggtcacattc gtggcgtggt tttcgatgtg	780
	tactccaccg agccttgca c tgattctcct ttgttcaagt tgcctcaggt tgttgtgact	840
20	cctcacttgg gtgcttctac tgaagaggct caggatcgtg cgggtactga cgttgctgat	900
	tctgtgctca aggcgctggc tggcgagttc gtggcggatg ctgtgaacgt ttccgggtgt	960
	cgctgtggcg aagaggttgc tgtgtggatg gatctggctt aa	1002
25	<210> 30 <211> 1233 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (G336V), SerA (G336V)	
	<400> 30	
35	atggcaaagg tatcgtgga gaaagacaag attaagthtc tgctggtaga aggcgtgcac	60
	caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct gtttacacca acatcgaatt tcacaaaggc	120
40	gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga	180
	tcccgtacc atctgactga agacgtgatc aacgcgcag aaaaactggt cgctattggc	240
	tgtttctgta tcggaacaaa ccaggthtga ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg	300
45	gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctgttgagg agctggtgat tggcgaactg	360
	ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac	420
50	aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt	480
	catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgtgg gaatgtatgt ttactthtga	540
	gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg	600
55	ctgaatatga gcgatgtggt gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg	660
	atgggcgcga aagaaatthc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttgcgc	720
60	ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaca tctggcgggg	780
	gcggcaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg	840
65		

ES 2 753 413 T3

	ctgtgtgaat tcgacaacgt ccttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg	900
	caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca	960
5	acgctctctg cgggtgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgttgg gcgtcgtctg	1020
	atgcacatcc acgaaaaccg tccgggctg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag	1080
10	cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt	1140
	attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt	1200
	ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa	1233
15	<210> 31 <211> 1233 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> serA * (G336V, G337V)  <400> 31	
25	atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac	60
	caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc	120
30	gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga	180
	tcccgtaccc atctgactga agacgtgatc aacgcccag aaaaactggc cgctattggc	240
	tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgcgg cggcaaagcg cgggatcccg	300
35	gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctggtgagg agctggtgat tggcgaactg	360
	ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac	420
40	aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt	480
	catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat	540
	gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg	600
45	ctgaatatga gcgatgtggt gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg	660
	atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttcgcgc	720
50	ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg	780
	gcggcaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg	840
	ctgtgtgaat tcgacaacgt ccttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg	900
55	caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca	960
	acgctctctg cgggtgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgttgt gcgtcgtctg	1020
60	atgcacatcc acgaaaaccg tccgggctg ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgccgag	1080
	cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtggtt	1140
	attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt	1200
65	ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa	1233

ES 2 753 413 T3

<210> 32  
 <211> 1233  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> serA \* (G336V, R338G)

<400> 32

10

atggcaaagg tatcgctgga gaaagacaag attaagtttc tgctggtaga aggcgtgcac 60  
 caaaaggcgc tggaaagcct tcgtgcagct ggttacacca acatcgaatt tcacaaaggc 120  
 15 gcgctggatg atgaacaatt aaaagaatcc atccgcgatg cccacttcat cggcctgcga 180  
 tcccgtaccc atctgactga agacgtgatc aacgcccag aaaaactggt cgctattggc 240  
 20 tgtttctgta tcggaacaaa ccaggttgat ctggatgctg cggcaaagcg cgggatcccg 300  
 gtatttaacg caccgttctc aaatacgcgc tctgttgctg agctggtgat tggcgaactg 360  
 ctgctgctat tgcgcggcgt gccggaagcc aatgctaaag cgcaccgtgg cgtgtggaac 420  
 25 aaactggcgg cgggttcttt tgaagcgcgc ggcaaaaagc tgggtatcat cggctacggt 480  
 catattggta cgcaattggg cattctggct gaatcgctgg gaatgtatgt ttacttttat 540  
 gatattgaaa ataaactgcc gctgggcaac gccactcagg tacagcatct ttctgacctg 600  
 30 ctgaatatga gcgatgtggt gagtctgcat gtaccagaga atccgtccac caaaaatatg 660  
 atgggcgcga aagaaatttc actaatgaag cccggctcgc tgctgattaa tgcttgcgcg 720  
 35 ggtactgtgg tggatattcc ggcgctgtgt gatgcgctgg cgagcaaaca tctggcgggg 780  
 gcggcaatcg acgtattccc gacggaaccg gcgaccaata gcgatccatt tacctctccg 840  
 ctgtgtgaat tcgacaacgt ctttctgacg ccacacattg gcggttcgac tcaggaagcg 900  
 40 caggagaata tcggcctgga agttgcgggt aaattgatca agtattctga caatggctca 960  
 acgctctctg cggtgaactt cccggaagtc tcgctgccac tgcacgttgg gggctcgtctg 1020  
 45 atgcacatcc acgaaaaccg tccgggctgt ctaactgcgc tgaacaaaat cttcgcggag 1080  
 cagggcgtca acatcgccgc gcaatatctg caaacttccg cccagatggg ttatgtgggt 1140  
 attgatattg aagccgacga agacgttgcc gaaaaagcgc tgcaggcaat gaaagctatt 1200  
 50 ccgggtacca ttcgcgcccg tctgctgtac taa 1233

<210> 33  
 <211> 362  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

55

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1).. (362)  
 <223> 3-fosfoserina/fosfohidroxitreonina aminotransferasa, SerC

60

<400> 33

65

ES 2 753 413 T3

Met Ala Gln Ile Phe Asn Phe Ser Ser Gly Pro Ala Met Leu Pro Ala  
 1 5 10 15  
 5  
 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  
 10  
 Val Ala Glu Glu Ala Glu Lys Asp Phe Arg Asp Leu Leu Asn Val Pro  
 50 55 60  
 15  
 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  
 20  
 Val Asp Ala Gly Tyr Trp Ala Ala Ser Ala Ile Lys Glu Ala Lys Lys  
 100 105 110  
 25  
 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  
 30  
 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  
 35  
 Ser Thr Ile Leu Ser Arg Pro Ile Asp Val Ser Arg Tyr Gly Val Ile  
 180 185 190  
 40  
 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  
 45  
 Ile Leu Asp Tyr Ser Ile Leu Asn Asp Asn Gly Ser Met Phe Asn Thr  
 225 230 235 240  
 50  
 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  
 55  
 Ala Glu Leu Leu Tyr Gly Val Ile Asp Asn Ser Asp Phe Tyr Arg Asn  
 275 280 285  
 60  
 Asp Val Ala Lys Ala Asn Arg Ser Arg Met Asn Val Pro Phe Gln Leu  
 65

ES 2 753 413 T3

	290		295		300	
	Ala Asp Ser Ala Leu Asp Lys Leu Phe Leu Glu Glu Ser Phe Ala Ala					
5	305		310		315	320
	Gly Leu His Ala Leu Lys Gly His Arg Val Val Gly Gly Met Arg Ala					
		325		330		335
10	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					
15		355		360		
	<210> 34					
	<211> 1089					
	<212> ADN					
	<213> Escherichia coli					
20	<220>					
	<221> gen					
	<222> (1).. (1089)					
	<223> 3-fosfoserina/fosfohidroxitreonina aminotransferasa, SerC					
25	<400> 34					
	atggctcaaa tcttcaattt tagttctggt cggcaatgc taccggcaga ggtgcttaaa					60
30	caggctcaac aggaactgcg cgactggaac ggtcttggtta cgtcggtgat ggaagtgagt					120
	caccgtggca aagagttcat tcaggttgca gaggaagccg agaaggattt tcgcatctt					180
	cttaatgtcc cctccaacta caaggatta ttctgccatg gcggtggtcg cggtcagttt					240
35	gctgcggtac cgctgaatat tctcggtgat aaaaccaccg cagattatgt tgatgccggt					300
	tactgggchg caagtgccat taaagaagcg aaaaaatact gcacgcctaa tgtctttgac					360
40	gccaaagtga ctggtgatgg tctgcgcgcg gttaagccaa tgcgtgaatg gcaactctct					420
	gataatgctg cttatatgca ttattgccc aatgaaacca tcgatggtat cgccatcgac					480
	gaaacgccag acttcggcgc agatgtggtg gtcgcccgtg acttctctc aaccattctt					540
45	tcccgtccga ttgacgtcag ccgttatggt gtaatttacg ctggcgcgca gaaaaatc					600
	ggcccggctg gcctgacaat cgtcatcgtt cgtgaagatt tgctgggcaa agcgaatc					660
50	gcggtgccgt cgattctgga ttattccatc ctcaacgata acggctccat gtttaacacg					720
	ccgccgacat ttgcctggta tctatctggt ctggtcttta aatggctgaa agcgaacggc					780
	ggtgtagctg aatggataa aatcaatcag caaaaagcag aactgctata tggggtgatt					840
55	gataacagcg atttctaccg caatgacgtg gcgaaagcta accgttcgcg gatgaacgtg					900
	ccgttcagt tggcggacag tgcgcttgac aaattgttcc ttgaagagtc ttttgctgct					960
60	ggccttcatg cactgaaagg tcaccgtgtg gtcggcgga tgcgcgcttc tatttataac					1020
	gccatgccgc tggaaggcgt taaagcgtg acagacttca tggttgagtt cgaacgccgt					1080
65	cacgggtaa					1089

## REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo capaz de producir O-fosfoserina (OPS), en el que (a) la actividad de un polipéptido, que  
5 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y es capaz de exportar O-  
fosfoserina, se mejora en comparación con su actividad endógena, y en el que:
- (b-1) la actividad de fosfoserina fosfatasa (SerB) se debilita adicionalmente en comparación con su  
actividad endógena, y/o  
10 (b-2) una actividad de fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA) o fosfoserina aminotransferasa (SerC)  
se mejora adicionalmente en comparación con su actividad endógena.
2. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo pertenece al género *Escherichia*,  
el género *Erwinia*, el género *Serratia*, el género *Providencia*, el género *Corynebacterium* o el género  
15 *Brevibacterium*.
3. El microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.
4. Uso de un microorganismo en el que la actividad de un polipéptido, que tiene una secuencia de  
aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y es capaz de exportar O-fosfoserina, aumenta en  
20 comparación con su actividad endógena, para producir O-fosfoserina (OPS).
5. El uso según la reivindicación 4, en el que, en el microorganismo, la actividad de fosfoserina fosfatasa  
(SerB) se debilita adicionalmente en comparación con su actividad endógena, y/o una actividad de  
fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA) o fosfoserina aminotransferasa (SerC) se mejora adicionalmente en  
25 comparación con su actividad endógena.
6. El uso según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el microorganismo pertenece al género  
*Escherichia*, el género *Erwinia*, el género *Serratia*, el género *Providencia*, el género *Corynebacterium* o el  
género *Brevibacterium*.  
30
7. El uso según la reivindicación 6, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.
8. Un procedimiento para producir O-fosfoserina (OPS), que comprende:
- 35 cultivar un microorganismo capaz de producir O-fosfoserina, en el que se mejora la actividad de un  
polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y es capaz de  
exportar O-fosfoserina, en un medio; y  
separar la O-fosfoserina del microorganismo capaz de producir O-fosfoserina, o el medio para la  
40 misma.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que, en el microorganismo capaz de producir O-  
fosfoserina, la actividad de fosfoserina fosfatasa (SerB) se debilita adicionalmente en comparación con su  
actividad endógena, y/o una actividad de fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA) o fosfoserina  
aminotransferasa (SerC) se mejora adicionalmente en comparación con su actividad endógena.  
45
10. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el microorganismo pertenece al género *Escherichia*, el  
género *Erwinia*, el género *Serratia*, el género *Providencia*, el género *Corynebacterium* o el género  
*Brevibacterium*.
- 50 11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.
12. Un procedimiento de producción de cisteína o un derivado de la misma, que comprende:
- a) producir O-fosfoserina (OPS) mediante el cultivo de un microorganismo capaz de producir O-  
fosfoserina, en el que se mejora una actividad de un polipéptido que tiene una secuencia de  
aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y es capaz de exportar O-fosfoserina, en un medio; y  
b) hacer reaccionar la O-fosfoserina (OPS) producida en a) o un cultivo que contiene la misma con un  
sulfuro, en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) o un microorganismo capaz de expresar la  
misma,  
60 en el que el derivado de cisteína se selecciona del grupo que consiste en N-acetilcisteína (NAC), S-  
carboximetilcisteína (SCMC), 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-Cys(Boc-  
metil)-OH, seleno-L-cisteína, S-(2-tiazolil)-L-cisteína, S-(2-tienil)-L-cisteína y S-(4-tolil)-L-cisteína.  
65

13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que el sulfuro es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{NaSH}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .
- 5 14. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que, en el microorganismo capaz de producir O-fosfoserina, una actividad de fosfoserina fosfatasa (SerB) se debilita adicionalmente en comparación con su actividad endógena, y/o una actividad de fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA) o fosfoserina aminotransferasa (SerC) se mejora adicionalmente en comparación con su actividad endógena.
- 10 15. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que el microorganismo pertenece al género *Escherichia*, el género *Erwinia*, el género *Serratia*, el género *Providencia*, el género *Corynebacterium* o el género *Brevibacterium*.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

[FIG. 1]

