

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 448**

51 Int. Cl.:

C12P 13/06 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2016 PCT/EP2016/051701**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120326**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2016 E 16701661 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3250700**

54 Título: **Método para la producción de L-serina usando microorganismos modificados por ingeniería genética deficientes para las vías de degradación de la serina**

30 Prioridad:

27.01.2015 EP 15152643

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

23.02.2021

73 Titular/es:

**CYSBIO APS (100.0%)
c/o Danmarks Tekniske Universitet, Kemitorget
220
2800 Kgs. Lyngby, DK**

72 Inventor/es:

**MUNDHADA, HEMANSHU y
NIELSEN, ALEX TOFTGAARD**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 807 448 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

Método para la producción de L-serina usando microorganismos modificados por ingeniería genética deficientes para las vías de degradación de la serina

5

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere, en general, a la industria microbiológica y específicamente, a la producción de L-serina usando bacterias modificadas genéticamente. La presente invención proporciona una bacteria genéticamente modificada que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, en donde los genes *sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA* se han inactivado, lo que hace que sea particularmente adecuada para la producción de L-serina con mayor rendimiento. La presente invención también proporciona medios mediante los que puede hacerse tolerante a la bacteria a mayores concentraciones de serina. La presente invención también proporciona métodos para la producción de L-serina o derivados de L-serina usando dicha bacteria genéticamente modificada.

10

15

Antecedentes de la invención

La L-serina es un aminoácido que en la actualidad se usa en la industria cosmética, farmacéutica y médica. La producción anual estimada de L-serina es de entre 300-1000 toneladas (Leuchtenberger *et al.*, 2005). El compuesto también se ha identificado como uno de los 30 agentes bioquímicos más importantes debido a su uso potencial como agente bioquímico de bloque de construcción. En la actualidad, la producción se basa en la conversión de glicina y metanol usando células en reposo (Hagishita *et al.*, 1996), donde los metiltrofos convierten el metanol en formaldehído y transfieren la unidad de CH₂-OH de la molécula a la glicina usando serina hidroximetiltransferasa (*glyA*). Este proceso de fermentación lento y la glicina es un material de partida costoso. Por tanto, es atractivo el desarrollo de un método para producir serina con un bajo coste a partir de glucosa.

20

25

La serina tiene el potencial de producirse a partir de glucosa mediante fermentación con un rendimiento teórico muy elevado (Burgard y Maranas, 2001). Sin embargo, hay que abordar varias complicaciones para aumentar el rendimiento, siendo la más importante la degradación de la serina en el organismo de producción. La serina tiene dos vías de degradación principales en *E. coli*. El catabolismo de serina a piruvato en *E. coli* está catalizado por tres desaminasas denominadas *sdaA*, *sdaB* y *tdcG*, mientras que *C. glutamicum* solo tiene una desaminasa (*sdaA*) con actividad frente a serina. En ambos organismos, la conversión de serina a glicina está codificada por *glyA*. Se ha probado la producción de serina mediante la supresión génica de las desaminasas en *E. coli* (Li *et al.*, 2012) y *C. glutamicum* (Peters-Wendisch *et al.*, 2005). En *E. coli* se observó la acumulación transitoria de 3,8 mg/l a partir de 1 g/l de glucosa cuando se sobreexpresó solo uno del gen de la vía (*serA*). La eliminación de la desaminasa en *C. glutamicum* da lugar a un aumento marginal y transitorio en el título de serina. En estudios recientes, se modificó *E. coli* por ingeniería genética para potenciar el flujo de 3-fosfoglicerato alterando el ciclo de TCA y el ciclo del glioxilato (Gu *et al.*, 2014). Se informó de que la cepa resultante, donde solo se retiró una desaminasa (*sdaA*), produce 8,45 g/l de serina a partir de 75 g/l de glucosa (rendimiento del 11,2 %).

30

35

40

La regulación negativa de *glyA* (Peters-Wendisch *et al.*, 2005) en *C. glutamicum* dio como resultado la producción de 9 g/l de serina a partir de 40 g/l de glucosa, pero da lugar a una cepa inestable. *glyA* es una importante enzima que convierte la serina en glicina y esta etapa transfiere una unidad de carbono al tetrahidrofolato (THF), que se usa como cofactor. La eliminación de la vía del ácido fólico y la suplementación de ácido fólico da lugar a una *C. glutamicum* estable y una producción de 36 g/l de serina, aunque con un rendimiento relativamente bajo (Stolz *et al.*, 2007).

45

No se ha logrado con anterioridad la eliminación de las dos vías principales de degradación de la serina (de serina a piruvato y de serina a glicina). Además, se sabe que la serina se vuelve tóxica incluso a bajas concentraciones en cepas que carecen de la vía de degradación de piruvato (Zhang y Newman, 2008). Se espera que la serina pueda inhibir la producción de aminoácidos ramificados en *E. coli* (Hama *et al.*, 1990) y la conversión de serina a hidroxipiruvato y acrilatos, que es tóxico para la célula (de Lorenzo, 2014). Para la producción eficiente de L-serina o un derivado de la misma, es por tanto deseable tanto suprimir las vías de degradación de la serina como abordar los problemas asociados con la toxicidad de la serina.

50

55

Sumario de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar medios que permiten una producción de L-serina más eficiente. Más particularmente, un objetivo de la presente invención es proporcionar medios que permiten la producción de L-serina con un mayor rendimiento nominal y un rendimiento en masa mejorado.

60

Esto se logra gracias al descubrimiento de que la producción de L-serina puede mejorarse mediante la inactivación de los genes *sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA*.

65

Por tanto, la presente invención proporciona en un primer aspecto una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente una bacteria que tiene la capacidad de producir L-serina, en donde dicha bacteria se ha modificado para inactivar los genes *sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA*.

La presente invención proporciona, en un segundo aspecto, un método para producir L-serina que comprende: cultivar la bacteria como se ha descrito anteriormente en un medio.

5 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Eliminación de los principales genes implicados en la degradación de la serina, *sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA* en *E. coli*. Se demostró la eliminación de los cuatro genes usando PCR con cebadores específicos para los genes relevantes.

10

Figura 2: Mapas de vectores para las construcciones (ejemplo 2).

Figura 3: Producción de serina durante la fermentación discontinua en matraces de agitación.

15

Figura 4: Puede lograrse tolerancia aumentada a la serina mediante la sobreexpresión de *ydeD*, un potencial transportador de serina. La figura muestra el crecimiento de las células en presencia de diversas concentraciones de serina.

20

Figura 5: Puede lograrse tolerancia aumentada a la serina mediante mutagénesis aleatoria. Se muestran las velocidades de crecimiento de la cepa precursora (Q1) y las cepas evolucionadas a diferentes concentraciones de serina.

25

Figura 6: Experimento de evolución adaptativa en laboratorio (ALE) para mejorar la tolerancia a la serina. (A) Velocidades de crecimiento durante el experimento de evolución. (B) Crecimiento mejorado de células evolucionadas en presencia de altas concentraciones de serina.

30

Figura 7: El efecto de las mutaciones en *thrA* en la tolerancia a la serina. Se introdujeron tres mutaciones específicas de *thrA* (Y356C, S357R, S359R) en el origen de Q1 y se comparó el crecimiento de los clones con el crecimiento de la cepa Q1 en presencia de 6,25 g/l de serina.

Figura 8: Identificación de mutaciones que causan tolerancia aumentada a la serina. Se usó análisis de secuenciación de amplicones para analizar el efecto de las mutaciones ALE después de la introducción en la cepa Q1 (DE3) mediante MAGE.

35

Figura 9: (A) Producción de serina y densidad celular (DO 600 nm) medidas en diferentes puntos de tiempo durante la fermentación discontinua alimentada de las cepas Q1(DE3) y Q3(DE3). (B) Producción de serina a partir de la glucosa añadida al fermentador. La pendiente de la curva indica el rendimiento en masa durante la fermentación.

40

Figura 10: (A) Densidad celular y título de serina de la cepa ALE 8-8 (DE3). (B) Rendimiento en masa a partir de glucosa.

45

Figura 11: Velocidad de crecimiento de cepas mutantes de *E. coli* que tienen diferentes sustituciones de aminoácidos observadas en las posiciones 356 (11A), 357 (11B) y 359 (11C) de ThrA, respectivamente (la sustitución de aminoácidos se indica por el respectivo código de una letra). La velocidad de crecimiento de *E. coli* que porta el gen *thrA* de tipo silvestre se indica como "ts".

A continuación, se describe la presente invención con más detalle.

50 Descripción detallada de la invención

Salvo que se definan específicamente en este documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en los campos de bioquímica, genética y microbiología.

55

Todos los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, con métodos y materiales adecuados que se describen en este documento. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes, a menos que se especifique de otro modo.

60

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología y ADN recombinante, que se encuentran entre las capacidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, EE. UU.); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis *et al.* Patente de

65

los Estados Unidos n.º 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries y S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); la serie, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson y M. Simon, redactores jefe, Academic Press, Inc., Nueva York), específicamente, los vol.154 y 155 (Wu *et al.* eds.) y el vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); y Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

Bacteria de la invención

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se basa, entre otras cosas, en el descubrimiento de que la producción de L-serina puede mejorarse mediante la inactivación de los genes *sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA*.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente una bacteria que tiene la capacidad de producir L-serina, en donde dicha bacteria se ha modificado para inactivar los genes *sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA*.

Los genes *sdaA*, *sdaB* y *tdcG* codifican la L-serina desaminasa I (SdaA), la L-serina desaminasa II (SdaB) y la L-serina desaminasa III (TdcG), respectivamente, que son las tres enzimas que llevan la etapa única en la vía de la degradación de la L-serina, que convierte la serina en el bloque de construcción celular básico, piruvato. Se encuentra disponible información adicional acerca de *sdaA*, *sdaB* y *tdcG* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con los números de referencia EG10930, EG11623 y G7624, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos representativas de *sdaA*, *sdaB* y *tdcG* se exponen en las SEQ ID NO: 1 a 3, respectivamente.

El gen *glyA* codifica serina hidroximetiltransferasa (GlyA) que convierte la serina en glicina, transfiriendo un grupo metilo al tetrahidrofolato, formando de este modo 5,10-metilen-tetrahidrofolato (5,10-mTHF). El 5,10-mTHF es la principal fuente de unidades C1 en la célula, lo que hace que GlyA sea una enzima clave en la biosíntesis de purinas, timidina, metionina, colina y lípidos. Se encuentra disponible información adicional acerca de *glyA* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10408. Se expone una secuencia de nucleótidos representativa de *glyA* en la SEQ ID NO: 4.

El reemplazo génico mediado por lambda-red (Datsenko y Wanner, 2000) es un método particularmente adecuado para inactivar uno o más genes como se describe en el presente documento. Por tanto, de acuerdo con realizaciones particulares, los genes se inactivan usando reemplazo génico mediado por lambda-red.

Como se muestra en la figura 3, la inactivación de los cuatro genes (*sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA*) implicados en la degradación de la serina da como resultado la máxima productividad específica y el máximo rendimiento a partir de la glucosa para la inactivación únicamente de los tres genes implicados en la degradación de la L-serina a través de la vía de serina a piruvato (*sdaA*, *sdaB* y *tdcG*).

La serina se produce a partir de gliceraldehído-3-fosfato usando tres enzimas codificadas por los genes *serA* (que codifica una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa), *serB* (que codifica una fosfoserina fosfatasa) y *serC* (que codifica una fosfoserina aminotransferasa). A fin de aumentar la producción de L-serina, estos genes pueden sobreexpresarse. Se encuentra disponible información relevante acerca de *serA*, *serB* y *serC* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con los números de referencia EG10944, EG10945 y EG10946, respectivamente.

Por tanto, de acuerdo con determinadas realizaciones, la bacteria se ha modificado para sobreexpresar una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, una fosfoserina fosfatasa y una fosfoserina aminotransferasa. Más particularmente, la bacteria se ha modificado adicionalmente para sobreexpresar los genes *serA*, *serB* y *serC*. Esto puede lograrse introduciendo en la bacteria una o más (tal como dos o tres) moléculas de ácido nucleico exógenas, tal como uno o más vectores, que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoserina fosfatasa y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoserina aminotransferasa.

La 3-fosfoglicerato deshidrogenasa puede proceder de la misma especie que la bacteria en la que se sobreexpresa o puede proceder de una especie diferente a aquella en la que se sobreexpresa (es decir, es heteróloga). De acuerdo con ciertas realizaciones, la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa procede de la misma especie que la bacteria en la que se sobreexpresa. De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa procede de una especie diferente a aquella en la que se sobreexpresa (es decir, es heteróloga).

De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una

5 secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, tal como al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa. Además, preferentemente, el polipéptido tiene una actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, en donde 1 o más, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 35, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, en donde de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5.

30 Además, es beneficioso sobreexpresar un gen *serA* mutante que codifica una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa que es resistente frente a la inhibición por retroalimentación de la serina. Esto puede, por ejemplo, lograrse mediante la eliminación de los cuatro restos C-terminales de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa de tipo silvestre (SerA). Como alternativa, la inhibición por retroalimentación de SerA puede eliminarse mutando los tres restos H344, N346 y N364 a alanina. Se expone una secuencia de aminoácidos representativa de dicho mutante de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa en la SEQ ID NO: 6. Por tanto, de acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa que es resistente a la degradación por retroalimentación de la serina. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, tal como al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, en donde 1 o más, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 35, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, en donde de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad 3-

fosfoglicerato deshidrogenasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad 3-fosfoglicerato deshidrogenasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.

5 La fosfoserina fosfatasa puede proceder de la misma especie que la bacteria en la que se sobreexpresa o puede proceder de una especie diferente a aquella en la que se sobreexpresa (es decir, es heteróloga). De acuerdo con ciertas realizaciones, la fosfoserina fosfatasa procede de la misma especie que la bacteria en la que se sobreexpresa. De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, la fosfoserina fosfatasa procede de una especie diferente a aquella en la que se sobreexpresa (es decir, es heteróloga).

10 De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoserina fosfatasa. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad fosfoserina fosfatasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad fosfoserina fosfatasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, tal como al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad fosfoserina fosfatasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad fosfoserina fosfatasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7, en donde 1 o más, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 35, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad fosfoserina fosfatasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad fosfoserina fosfatasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7, en donde de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad fosfoserina fosfatasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad fosfoserina fosfatasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7.

45 La fosfoserina aminotransferasa puede proceder de la misma especie que la bacteria en la que se sobreexpresa o puede proceder de una especie diferente a aquella en la que se sobreexpresa (es decir, es heteróloga). De acuerdo con ciertas realizaciones, la fosfoserina aminotransferasa procede de la misma especie que la bacteria en la que se sobreexpresa.

50 De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, la fosfoserina aminotransferasa procede de una especie diferente a aquella en la que se sobreexpresa (es decir, es heteróloga).

55 De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoserina aminotransferasa. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad fosfoserina aminotransferasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad fosfoserina aminotransferasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, tal como al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad fosfoserina aminotransferasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad fosfoserina aminotransferasa.

similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8, en donde 1 o más, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 35, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad fosfoserina aminotransferasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad fosfoserina aminotransferasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8, en donde de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad fosfoserina aminotransferasa. Más preferentemente, el polipéptido tiene una actividad fosfoserina aminotransferasa similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8.

Una bacteria, tal como *Escherichia coli*, que se ha modificado para inactivar los genes *sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA*, puede mostrar baja tolerancia a la serina. Por tanto, sería deseable proporcionar una bacteria que muestre tolerancia aumentada frente a la serina.

A este respecto, los presentes inventores han descubierto que puede reducirse la toxicidad del producto mediante la sobreexpresión de nuevos exportadores, mediante evolución de cepas bacterianas mediante mutagénesis aleatoria y mediante evolución adaptativa. Como resultado, se proporcionan bacterias que tienen tolerancia aumentada a la serina. "Tolerancia aumentada", como se usa en el presente documento, significa que una bacteria es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 6,25 g/l.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la presente invención es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 6,25 g/l (tal como al menos aproximadamente 12,5 g/l). De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 12,5 g/l (tal como al menos aproximadamente 25 g/l). De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 25 g/l (tal como al menos aproximadamente 40 g/l). De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 40 g/l (tal como al menos aproximadamente 50 g/l). De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 50 g/l (tal como al menos aproximadamente 75 g/l). De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 75 g/l (tal como al menos aproximadamente 100 g/l). De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 100 g/l.

Preferentemente, el medio de cultivo mínimo, tal como medio mínimo M9, se suplementa con glicina 2 mM y 2 g/l de glucosa. La bacteria se cultiva generalmente usando aireación adecuada a aproximadamente 37 °C durante un periodo de aproximadamente 24 a aproximadamente 40 horas.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la presente invención es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 6,25 g/l (tal como al menos aproximadamente 12,5 g/l) a una velocidad de crecimiento de al menos 0,1 h⁻¹ durante el crecimiento exponencial. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 12,5 g/l (tal como al menos aproximadamente 25 g/l) a una velocidad de crecimiento de al menos 0,1 h⁻¹ durante el crecimiento exponencial. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo (tal como medio mínimo M9) que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 25 g/l (tal como al menos aproximadamente 50 g/l) a una velocidad de crecimiento de al menos 0,1 h⁻¹ durante el crecimiento exponencial.

Preferentemente, el medio de cultivo mínimo, tal como medio mínimo M9, se suplementa con glicina 2 mM y 2 g/l de glucosa. La bacteria se cultiva generalmente usando aireación adecuada a aproximadamente 37 °C durante un periodo de aproximadamente 24 a aproximadamente 40 horas.

Un nuevo exportador que cuando se sobreexpresa en una bacteria mejoró la tolerancia a la serina es la proteína exportadora de O-acetilserina/cisteína codificada por el gen *ydeD*. Se encuentra disponible información adicional

acerca de *ydeD* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG11639. Se expone una secuencia de aminoácidos representativa de dicha proteína exportadora en la SEQ ID NO: 9. Por tanto, la presente invención proporciona una bacteria que se ha modificado para sobreexpresar el gen *ydeD*.

- 5 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende una molécula de ácido nucleico exógena, tal como un vector de expresión, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el producto de proteína del gen *ydeD*. De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender
- 10 una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína. Más preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, tal como al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína. Más preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, en donde 1 o más, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 35, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados.
- 15 Preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína. Más preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, en donde de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40 Se expone un polipéptido de YdeD modificado que contiene un tramo adicional de 6 restos de histidina en el extremo C-terminal en la SEQ ID NO: 10. De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína. Más preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, tal como al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10. Preferentemente, el polipéptido
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína. Más preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10, en donde 1 o más, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 35, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína. Más preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10. La molécula de ácido nucleico exógena puede comprender

una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10, en donde de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido están sustituidos, eliminados y/o insertados. Preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína. Más preferentemente, el polipéptido tiene actividad transportadora de O-acetilserina y/o cisteína similar a la del polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10.

Como se muestra en la figura 4, el crecimiento de una bacteria, tal como *E. coli*, que carece de las principales vías de degradación de la serina es un crecimiento gravemente inhibido en presencia de concentraciones incluso bajas de serina. Tras la sobreexpresión de *ydeD*, aumenta sustancialmente la tolerancia frente a la serina, lo que sugiere que YdeD puede potencialmente transportar la serina fuera de la célula.

Una bacteria de la invención que tiene tolerancia aumentada frente a la serina, tal como una capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 6,25 g/l como se ha mencionado anteriormente, puede obtenerse mediante mutagénesis aleatoria o mediante evolución adaptativa. Los detalles pertinentes se proporcionan en los ejemplos 4 y 5, respectivamente.

La evolución adaptativa puede, por ejemplo, lograrse llevando a cabo el siguiente método: Antes de iniciar el experimento, se rellenan tubos adecuados con 25 ml de medio de cultivo que se mantienen a 37 °C en un bloque de calentamiento. Se obtiene aireación controlada usando agitadores por volteo magnéticos dentro de los tubos y centrifugando a 1.800 rpm. Al comienzo del experimento, se cultiva una sola colonia (de la cepa inicial) durante una noche en uno de los tubos y se usan alícuotas de 100 µl para inocular un nuevo tubo que contiene 25 ml de medio de cultivo fresco. A medida que crecen las bacterias, se efectúan múltiples mediciones de la DO a 600 nm. Las velocidades de crecimiento se calculan tomando la pendiente de un ajuste lineal de regresión lineal de mínimos cuadrados al logaritmo de las mediciones de la DO. Una vez que se alcanza una DO diana de 0,4, se usan 100 µl de cultivo para inocular un nuevo tubo que contiene 25 ml de medio de cultivo. De esta forma, los cultivos se pasan en serie (2-3 veces al día) a tubos con medio fresco después de alcanzar la densidad celular diana, de tal forma que nunca se alcanza la fase estacionaria. El experimento se inicia con una concentración de L-serina de 3 g/l de serina, seguido de un aumento a 6 g/l de L-serina después de que se haya alcanzado la velocidad de crecimiento deseada. Una vez que las poblaciones lograron un fenotipo estable (es decir, velocidad de crecimiento), se aumenta la concentración de L-serina hasta 12 g/l. Este proceso se repite de manera iterativa usando 24, 50, 75 y 100 g/l de L-serina. Después, puede emplacarse la población final en el LB-agar para el cultivo y la selección adicional de una cepa tolerante a L-serina. El método anterior puede efectuarse manualmente o usando un sistema automatizado que permite la propagación de las poblaciones en evolución a lo largo de varios días mientras se monitorizan sus velocidades de crecimiento.

Como se demuestra adicionalmente en el presente documento, los presentes inventores han identificado mutaciones beneficiosas en una serie de genes que confieren tolerancia frente a la L-serina. Los genes respectivos y las mutaciones se representan en la tabla S5.

Un gen de este tipo es *thrA*, que codifica una aspartato cinasa I/homoserina deshidrogenasa (ThrA). Se encuentra disponible información adicional acerca de *thrA* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10998. Se expone una secuencia de aminoácidos representativa de una aspartato cinasa I/homoserina deshidrogenasa I de tipo silvestre (ThrA) en la SEQ ID NO: 11. Como se demuestra en el ejemplo 6 y 10, la introducción de ciertas mutaciones en la secuencia de aminoácidos de la aspartato cinasa I/homoserina deshidrogenasa da como resultado un aumento muy significativo en la tolerancia frente a la serina (figuras 7 y 11). En particular, se ha demostrado que las siguientes mutaciones son beneficiosas: Y356C, S357R y S359R.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que expresa un mutante de aspartato cinasa I/homoserina deshidrogenasa I (ThrA) que no se inhibe por L-serina.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos en el polipéptido codificado en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en Y356, S357 y S359. Una bacteria de la invención puede expresar, por tanto, una aspartato cinasa I/homoserina deshidrogenasa I (ThrA) que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en Y356, S357 y S359. Más particularmente, una bacteria de la invención puede expresar un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en Y356, S357 y S359. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición Y356. Por lo tanto, una bacteria de la invención puede expresar un polipéptido codificado por

S357 y S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356 y S357, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; y la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356 y S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición S357 y S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L; y en donde 1 o más, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 35, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido adicionales están sustituidos, eliminados y/o insertados.

La bacteria puede expresar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L; y en donde de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido adicionales están sustituidos, eliminados y/o insertados.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos en el polipéptido codificado seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C, S357R y S359R. Por lo tanto, una bacteria

de la invención puede expresar un polipéptido codificado por el gen *thrA*, en donde dicho polipéptido comprende una o más (tal como dos o tres) sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C, S357R y S359R. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más (tal como dos) sustituciones de aminoácidos en el polipéptido codificado seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C y S357R. Por lo tanto, una bacteria de la invención puede expresar un polipéptido codificado por el gen *thrA*, en donde dicho polipéptido comprende una o más (tal como dos) sustituciones de aminoácidos en el polipéptido codificado seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C y S359R. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más (tal como dos) sustituciones de aminoácidos en el polipéptido codificado seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C y S359R. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más (tal como dos) sustituciones de aminoácidos en el polipéptido codificado seleccionadas entre el grupo que consiste en S357R y S359R. Por lo tanto, una bacteria de la invención puede expresar un polipéptido codificado por el gen *thrA*, en donde dicho polipéptido comprende una o más (tal como dos) sustituciones de aminoácidos en el polipéptido codificado seleccionadas entre el grupo que consiste en S357R y S359R.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución Y356C en el polipéptido codificado. Por lo tanto, una bacteria de la invención puede expresar un polipéptido codificado por el gen *thrA*, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución Y356C. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución S357R en el polipéptido codificado. Por lo tanto, una bacteria de la invención puede expresar un polipéptido codificado por el gen *thrA*, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución S357R. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución S359R en el polipéptido codificado. Por lo tanto, una bacteria de la invención puede expresar un polipéptido codificado por el gen *thrA*, en donde dicho polipéptido comprende una sustitución S359R.

Una bacteria de la invención puede expresar, por tanto, una aspartato cinasa I/homoserina deshidrogenasa I (ThrA) que tiene una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C, S357R y S359R. Más particularmente, una bacteria de la invención puede expresar un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C, S357R y S359R. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria expresa un polipéptido que expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en la posición 356, la tirosina se reemplaza por cisteína. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria expresa un polipéptido que expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en la posición 357, la serina se reemplaza por arginina. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria expresa un polipéptido que expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en la posición 359, la serina se reemplaza por arginina.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria expresa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C, S357R y S359R.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria expresa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en la posición 356, la tirosina se reemplaza por cisteína.

De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria expresa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, tal como al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en la posición 356, la tirosina se reemplaza por cisteína.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en la posición 357, la serina se reemplaza por arginina. De acuerdo con realizaciones

particulares, la bacteria expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, tal como al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en la posición 357, la serina se reemplaza por arginina.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en la posición 359, la serina se reemplaza por arginina. De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en la posición 359, la serina se reemplaza por arginina.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria expresa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una o más sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C, S357R y S359R, en donde 1 o más, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 35, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido adicionales están sustituidos, eliminados y/o insertados. La bacteria puede expresar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una o más sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C, S357R y S359R, en donde de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, restos de aminoácido adicionales están sustituidos, eliminados y/o insertados.

Los uno o más mutantes del polipéptido ThrA descritos anteriormente pueden (sobre)expresarse por la bacteria por medio de una molécula de ácido nucleico exógena, tal como un vector de expresión, que se ha introducido en la bacteria. Por tanto, de acuerdo con determinadas realizaciones, la bacteria de la invención comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de aspartato cinasa I/homoserina deshidrogenasa I (ThrA) mutante como se ha descrito anteriormente.

Por ejemplo, una bacteria de la invención puede comprender una molécula de ácido nucleico exógena, tal como un vector de expresión, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria de la invención comprende por tanto una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.

A este respecto, la presente invención proporciona además una molécula de ácido nucleico (aislada), tal como un vector de expresión, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un mutante de ThrA como se ha descrito anteriormente. Dicho ácido nucleico puede introducirse en la bacteria de la invención. De acuerdo con ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359. De acuerdo con ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359; en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359. De acuerdo con ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Y356, S357 y/o S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se

selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.

5 La molécula de ácido nucleico (aislada) puede ser el ácido nucleico exógeno detallado anteriormente. La molécula de ácido nucleico (aislada) puede comprender elementos reguladores adecuados, tales como un promotor que es funcional en la célula bacteriana para provocar la producción de una molécula de ARNm y que está ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido. Se proporcionan detalles adicionales acerca de elementos reguladores adecuados con respecto a una molécula de ácido nucleico "exógena" y se aplican cambiando lo que sea necesario.

10 La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *lrp* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos D143G en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *lrp* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10547. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *lrp*, en donde en dicho polipéptido en la posición 143, D se reemplaza por G. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *lrp* en la SEQ ID NO: 12. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 143, D se reemplaza por G.

25 De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *lrp* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *lrp* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición D143. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 143, D se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

40 La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *rho* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos R87L en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional relativa a *rho* de, por ejemplo, *Escherichia coli*, tal como una secuencia de nucleótidos del gen o una secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10845. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *rho*, en donde en dicho polipéptido en la posición 87, R se reemplaza por L. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *rho* en la SEQ ID NO: 13. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 87, R se reemplaza por L.

50 De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *rho* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *rho* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición R87. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 87, R se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

65 La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *eno* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *eno* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el

número de referencia EG10258. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *eno*, en donde en dicho polipéptido en la posición 164 V se reemplaza por L. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *eno* en la SEQ ID NO: 14. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención puede expresar por tanto un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición en la posición 164 V se reemplaza por L.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *eno* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *eno* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición V164. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 164 V se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *argP* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *argP* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10490. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *argP*, en donde en dicho polipéptido en la posición 132, Q se reemplaza por K. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *argP* en la SEQ ID NO: 15. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición en la posición 132, Q se reemplaza por K.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *argP* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *argP* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición Q132. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 132, Q se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *tufA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos G19V en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *thrA* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG11036. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *tufA*, en donde en dicho polipéptido en la posición 19, G se reemplaza por V. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *tufA* en la SEQ ID NO: 16. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición en la posición 19, G se reemplaza por V.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *tufA*

una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *tufA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición G19. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 19, G se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *cycA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos I220V en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *cycA* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG12504. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *cycA*, en donde en dicho polipéptido en la posición 220, I se reemplaza por V. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *cycA* en la SEQ ID NO: 17. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 17 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 17, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición en la posición 220, I se reemplaza por V.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *cycA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *cycA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición 1220. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 17 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 17, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 220, I se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *rpe* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos I202T en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *rpe* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia M004. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *rpe*, en donde en dicho polipéptido en la posición 202, I se reemplaza por T. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *rpe* en la SEQ ID NO: 18. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición en la posición 202, I se reemplaza por T.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *rpe* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *rpe* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición 2021. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 202, I se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *yojI* una o más sustituciones de

nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos D334H en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *yojI* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG12070. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *yojI*, en donde en dicho polipéptido en la posición 334, D se reemplaza por H. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *yojI* en la SEQ ID NO: 19. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición en la posición 334, D se reemplaza por H.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *yojI* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *yojI* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición D334. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 334, D se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *hyaF* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V120G en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *hyaF* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10473. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *hyaF*, en donde en dicho polipéptido en la posición 120 V se reemplaza por G. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *hyaF* en la SEQ ID NO: 20. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición en la posición 120 V se reemplaza por G.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *hyaF* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *hyaF* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición V120. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 120 V se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *pykF* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos E250* en el polipéptido codificado, donde * indica un codón de parada. Como alternativa, el gen *pykF* puede comprender una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la terminación del polipéptido codificado en una posición cadena arriba de la posición 250. Se encuentra disponible información adicional acerca de *pykF* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10804. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *pykF*, en donde dicho polipéptido termina después de la posición 249 o cualquier posición cadena arriba de la misma. Se expone una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *pykF* en la SEQ ID NO: 21. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad

de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22.

De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, una bacteria de la invención se ha modificado adicionalmente para atenuar la expresión del gen *pykF* (por ejemplo, mediante inactivación del gen). La atenuación y más particularmente la inactivación, de la expresión génica puede lograrse como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse reemplazo génico mediado por lambda red para inactivar la expresión génica.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *malT* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos Q420* en el polipéptido codificado, donde * indica un codón de parada. Como alternativa, el gen *malT* puede comprender una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la terminación del polipéptido codificado en una posición cadena arriba de la posición 420. Se encuentra disponible información adicional acerca de *malT* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10562. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *malT*, en donde dicho polipéptido termina después de la posición 419 o cualquier posición cadena arriba de la misma. Se expone una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *malT* en la SEQ ID NO: 23. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 24 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 24.

De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, una bacteria de la invención se ha modificado adicionalmente para atenuar la expresión del gen *malT* (por ejemplo, mediante inactivación del gen). La atenuación y más particularmente la inactivación, de la expresión génica puede lograrse como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse reemplazo génico mediado por lambda red para inactivar la expresión génica.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *rpoB* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos P520L en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *rpoB* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10894. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *rpoB*, en donde en dicho polipéptido en la posición 520, P se reemplaza por L. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *rpoB* en la SEQ ID NO: 25. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 25 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 25, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición en la posición 520, P se reemplaza por L.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *rpoB* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *rpoB* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición P520. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 25 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 25, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 520, P se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *fumB* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos T218P en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *fumB* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10357. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *fumB*, en donde en dicho polipéptido en la posición 218, T se reemplaza por P. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *fumB* en la SEQ ID NO: 26. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición en la posición 218, T se reemplaza

por P.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *fumB* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *fumB* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición T218. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 218, T se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *gshA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos A178V en el polipéptido codificado. Se encuentra disponible información adicional acerca de *gshA* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10418. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *gshA*, en donde en dicho polipéptido en la posición 178 A se reemplaza por V. Se proporciona una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *gshA* en la SEQ ID NO: 27. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición en la posición 178 A se reemplaza por V.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una bacteria que comprende en el gen *gshA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la tolerancia frente a la L-serina. Más particularmente, se proporciona una bacteria que comprende en el gen *gshA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición A178. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 178 A se reemplaza por otro aminoácido. Preferentemente, las una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservativas.

La presente invención también proporciona una bacteria que comprende en el gen *lamB* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos Q112 * en el polipéptido codificado, donde * indica un codón de parada. Como alternativa, el gen *lamB* puede comprender una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la terminación del polipéptido codificado en una posición cadena arriba de la posición 112. Se encuentra disponible información adicional relativa a *lamB* de, por ejemplo, *Escherichia coli*, tal como una secuencia de nucleótidos del gen o una secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG10528. De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *lamB*, en donde dicho polipéptido termina después de la posición 111 o cualquier posición cadena arriba de la misma. Se expone una secuencia de aminoácidos representativa de un polipéptido codificado por el gen *lamB* en la SEQ ID NO: 28. De acuerdo con realizaciones particulares, una bacteria de la invención expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29.

De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, una bacteria de la invención se ha modificado adicionalmente para atenuar la expresión del gen *lamB* (por ejemplo, mediante inactivación del gen). La atenuación y más particularmente la inactivación, de la expresión génica puede lograrse como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse reemplazo génico mediado por lambda red para inactivar la expresión génica.

Una bacteria de la presente invención puede comprender una o más, tal como dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más, mutaciones génicas como se ha mencionado.

Por ejemplo, la bacteria puede comprender una o más (tal como dos o más) mutaciones génicas seleccionadas entre el grupo que consiste en: una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *lrp* que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en la posición D143 en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *rho* que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en la posición R87 en el polipéptido codificado, una o más sustituciones en el gen *eno* que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en la posición V164 en el polipéptido codificado y una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *argP* que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en la posición V164 en el polipéptido codificado.

Por ejemplo, la bacteria puede comprender una o más (tal como dos o más) mutaciones génicas seleccionadas entre el grupo que consiste en: una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *lrp* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos D143G en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *rho* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos R87L en el polipéptido codificado, una o más sustituciones en el gen *eno* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado y una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *argP* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición Y356, seleccionándose dicha sustitución entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición S357, seleccionándose dicha sustitución entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y/o una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición S359, seleccionándose dicha sustitución entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L; y una o más (tal como dos o más) mutaciones génicas seleccionadas entre el grupo que consiste en: una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *lrp* que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en la posición D143 (tal como D143G) en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *rho* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos en la posición R87 (tal como R87L) en el polipéptido codificado, una o más sustituciones en el gen *eno* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos en la posición V164 (tal como V164L) en el polipéptido codificado y una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *argP* que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en la posición V164 (tal como V164L) en el polipéptido codificado.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la presente invención comprende una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *thrA* que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos en el polipéptido seleccionado seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C, S357R y S359R; y una o más (tal como dos o más) mutaciones génicas seleccionadas entre el grupo que consiste en: una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *lrp* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos D143G en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *rho* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos R87L en el polipéptido codificado, una o más sustituciones en el gen *eno* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado y una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *argP* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la presente invención comprende una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *thrA* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos Y356C en el polipéptido codificado; y una o más (tal como dos o más) mutaciones génicas seleccionadas entre el grupo que consiste en: una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *lrp* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos D143G en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *rho* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos R87L en el polipéptido codificado, una o más sustituciones en el gen *eno* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado y una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *argP* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la presente invención comprende una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *thrA* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos S357R en el polipéptido codificado; y una o más (tal como dos o más) mutaciones génicas seleccionadas entre el grupo que consiste en: una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *lrp* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos D143G en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *rho* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos R87L en el polipéptido codificado, una o más sustituciones en el gen *eno* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado y una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *argP* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado.

De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la presente invención comprende una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *thrA* que dan como resultado la sustitución S359R en el polipéptido codificado; y una o más (tal como dos o más) mutaciones génicas seleccionadas entre el grupo que consiste en: una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *lrp* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos D143G en el polipéptido codificado,

una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *rho* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos R87L en el polipéptido codificado, una o más sustituciones en el gen *eno* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado y una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *argP* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado.

5 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en su genoma una eliminación de los primeros 5 pb del gen *rhtA*, una eliminación completa de los genes *ompX* e *ybiP*, una eliminación de 239 pb del gen *rybA* y una eliminación de 77 pb del gen *mntS*. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en su genoma una eliminación de aproximadamente 2854 pb de una ubicación que corresponde a la ubicación 850092 en la secuencia genómica NC_000913. Esta eliminación da como resultado una eliminación de los primeros 5 pb del gen *rhtA*, una eliminación completa de los genes *ompX* e *ybiP*, una eliminación de 239 pb del gen *rybA* y una eliminación de 77 pb del gen *mntS*. Dicha eliminación puede lograrse usando el sistema lambda-red o cam-sacB.

15 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en su genoma una inserción de un elemento de secuencia de inserción IS1 (por ejemplo, que tiene una longitud de aproximadamente 768 pb) en la región intergénica entre los genes *trxA* y *rho*. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en su genoma una inserción de un elemento de secuencia de inserción IS1 (por ejemplo, que tiene una longitud de aproximadamente 768 pb) en la hebra retardada en una ubicación que corresponde a la ubicación 3966174 en la secuencia genómica NC_000913. De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria comprende además una duplicación de aproximadamente 9 pb cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de inserción.

20 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en su genoma una inserción de 1 pb en la región intergénica entre los genes *gcvA* e *ygdl*. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en su genoma una inserción de 1 pb en una ubicación que corresponde a la ubicación 2942629 en la secuencia genómica NC_000913.

25 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en su genoma una inserción de un elemento de secuencia de inserción IS4 (por ejemplo, que tiene una longitud de aproximadamente 1342 pb) en la región intergénica entre los genes *gcvA* e *ygdl*. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en su genoma una inserción de un elemento de secuencia de inserción IS4 (por ejemplo, que tiene una longitud de aproximadamente 1342 pb) en una ubicación que corresponde a la ubicación 2942878 en la secuencia genómica NC_000913. De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria comprende además una duplicación de aproximadamente 13 pb cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de inserción.

30 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en su genoma una inserción de 1 pb en la región intergénica entre los genes *dapA* y *gcvR*. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en su genoma una inserción de 1 pb en una ubicación que corresponde a la ubicación 2599854 en la secuencia genómica NC_000913.

35 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en su genoma una inserción de un elemento de secuencia de inserción IS1 (por ejemplo, que tiene una longitud de aproximadamente 768 pb) que da lugar a un truncamiento del gen *frc*. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en su genoma un elemento de secuencia de inserción IS1 (por ejemplo, que tiene una longitud de aproximadamente 768 pb) en la hebra retardada en una ubicación que corresponde a la ubicación 2492323 en la secuencia genómica NC_000913. De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria comprende además una duplicación de 9 pb cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de inserción.

40 De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, una bacteria de la invención se ha modificado adicionalmente para atenuar la expresión del gen *frc* (por ejemplo, mediante inactivación del gen). La atenuación y más particularmente la inactivación, de la expresión génica puede lograrse como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse reemplazo génico mediado por lambda red para inactivar la expresión génica.

45 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en su genoma una inserción de un elemento de secuencia de inserción IS5 (por ejemplo, que tiene una longitud de aproximadamente 1195 pb) que da lugar a la eliminación de la mayoría del gen *aroP*. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en su genoma un elemento de secuencia de inserción IS5 (por ejemplo, que tiene una longitud de aproximadamente 1195 pb) en una ubicación que corresponde a la ubicación 121518 en la secuencia genómica NC_000913. De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria comprende además una duplicación de 4 pb cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de inserción.

50 De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, una bacteria de la invención se ha modificado adicionalmente para atenuar la expresión del gen *aroP* (por ejemplo, mediante inactivación del gen). La atenuación y más particularmente la inactivación, de la expresión génica puede lograrse como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse reemplazo génico mediado por lambda red para inactivar la expresión génica.

55 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en su genoma una inserción de un

- elemento de secuencia de inserción IS1 (por ejemplo, que tiene una longitud de aproximadamente 768 pb) en la región intergénica entre los genes *mdtJ* y *tqsA*. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en su genoma un elemento de secuencia de inserción IS1 (por ejemplo, que tiene una longitud de aproximadamente 768 pb) en la hebra retardada en una ubicación que corresponde a la ubicación 1673670 en la secuencia genómica NC_000913.
- 5 De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria comprende además una duplicación de aproximadamente 9 pb cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de inserción.
- De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en su genoma una sustitución de nucleótidos, tal como una sustitución C->T, en la región intergénica entre los genes *trxB* e *lrp*. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en su genoma una sustitución de nucleótidos, tal como una sustitución C->T, en una ubicación que corresponde a la ubicación 923321 en la secuencia genómica NC_000913. Dicha mutación se encuentra a 271 pb cadena arriba de *trxB* y a 274 pb cadena arriba de *lrp*.
- 10 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención comprende en su genoma una sustitución de nucleótidos, tal como una sustitución T->C, en la región intergénica entre los genes *yftB* y *fkIB*. De acuerdo con ciertas realizaciones, la bacteria comprende en su genoma una sustitución de nucleótidos, tal como una sustitución T->C, en una ubicación que corresponde a la ubicación 4428871 en la secuencia genómica NC_000913. Dicha mutación se encuentra a 154 pb cadena arriba de *yftB* y a 64 pb cadena arriba de *fkIB*.
- 15 Como se demuestra adicionalmente en el presente documento, la atenuación (por ejemplo, mediante inactivación del gen) de la expresión de un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PDH) en una cepa modificada por ingeniería genética inversa dio como resultado una producción y rendimiento significativamente aumentados de L-serina a partir de glucosa, como se muestra en la tabla S9 (ejemplo 8).
- 20 Por tanto, de acuerdo con determinadas realizaciones, se ha modificado una bacteria de la invención para atenuar la expresión de un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PDH). Más particularmente, la presente invención proporciona una bacteria que se ha modificado para atenuar la expresión del gen *zwf*. Se encuentra disponible información adicional acerca de *zwf* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG11221. Se expone una secuencia de nucleótidos representativa de *zwf* en la SEQ ID NO: 30.
- 25 La expresión génica puede atenuarse mediante la inactivación del gen. Por tanto, una bacteria de acuerdo con la invención puede ser una que se ha modificado para inactivar el gen que codifica un polipéptido que tiene actividad glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PDH) (por ejemplo, mediante inactivación del gen).
- 30 La atenuación y más particularmente la inactivación, de la expresión génica puede lograrse como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse reemplazo génico mediado por lambda red para inactivar la expresión génica.
- 35 De acuerdo con ciertas realizaciones, una bacteria de la invención expresa un polipéptido codificado por el gen *bmQ*, en donde dicho polipéptido termina después de la posición 308 o cualquier posición cadena arriba de la misma. De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, una bacteria de la invención se ha modificado adicionalmente para atenuar la expresión del gen *bmQ* (por ejemplo, mediante inactivación del gen). La atenuación y más particularmente la inactivación, de la expresión génica puede lograrse como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse reemplazo génico mediado por lambda red para inactivar la expresión génica.
- 40 De acuerdo con ciertas realizaciones, se ha modificado adicionalmente una bacteria de la invención para atenuar la expresión de un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PDH); expresar un polipéptido codificado por el gen *thrA*, en donde en dicho polipéptido, en la posición 357 la serina se reemplaza por arginina; expresa un polipéptido codificado por el gen *rho*, en donde en dicho polipéptido, en la posición 87 R se reemplaza por L; y expresa un polipéptido codificado por el gen *bmQ*, en donde dicho polipéptido termina después de la posición 308 o cualquier posición cadena arriba de la misma. Como alternativa, la bacteria puede modificarse para atenuar la expresión del gen *bmQ* (por ejemplo, mediante inactivación del gen). Se han descrito anteriormente métodos adecuados para la atenuación de la expresión génica.
- 45 Se encuentra disponible información adicional acerca de *bmQ* de, por ejemplo, *Escherichia coli* en EcoCyc (www.biocyc.org) con el número de referencia EG12168. Se expone una secuencia de aminoácidos representativa de *bmQ* en la SEQ ID NO: 31.
- 50 De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria se ha modificado adicionalmente para atenuar la expresión del gen *zwf* (por ejemplo, mediante inactivación del gen); expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 357, la serina se reemplaza por arginina; expresa un polipéptido que tiene la secuencia
- 55
- 60
- 65

de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 87, R se reemplaza por L; y expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32.

De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria se ha modificado adicionalmente para atenuar la expresión del gen *zwf* y *brnQ* (por ejemplo, mediante inactivación de los genes); y expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 357, la serina se reemplaza por arginina; expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13 o un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, en donde en dicha secuencia de aminoácidos en la posición 87, R se reemplaza por L.

Como se ha detallado anteriormente, una bacteria de la invención puede haberse modificado para sobreexpresar ciertos polipéptidos como se detalla en el presente documento, lo que significa que se ha introducido en la bacteria una molécula de ácido nucleico exógena, tal como una molécula de ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido. Los expertos en la materia conocen técnicas para introducir una molécula de ácido nucleico exógena, tal como una molécula de ADN, en una célula bacteriana e incluyen transformación (por ejemplo, transformación por choque térmico o natural), entre otras.

Para facilitar la sobreexpresión de un polipéptido en la bacteria, la molécula de ácido nucleico exógena puede comprender elementos reguladores adecuados, tales como un promotor que es funcional en la célula bacteriana para provocar la producción de una molécula de ARNm y que está ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido.

Los promotores útiles de acuerdo con la invención son cualquier promotor conocido que sea funcional en una célula hospedadora dada para provocar la producción de una molécula de ARNm. La persona experta conoce muchos de estos promotores. Dichos promotores incluyen promotores normalmente asociados con otros genes y/o promotores aislados de cualquier bacteria. Los expertos en la técnica de biología molecular conocen generalmente el uso de promotores para la expresión de proteínas, por ejemplo, véase Sambrook *et al.*, "Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. El promotor empleado puede ser inducible, tal como un promotor inducible por temperatura (por ejemplo, los promotores pL o pR de fago lambda, cada uno de los cuales puede estar controlado por el represor lambda sensible a la temperatura c1857). El término "inducible" usado en el contexto de un promotor significa que el promotor solo dirige la transcripción de una secuencia de nucleótidos unida operativamente si hay un estímulo presente, como un cambio de temperatura o la presencia de una sustancia química ("inductor químico"). Como se usa en el presente documento, "inducción química" de acuerdo con la presente invención se refiere a la aplicación física de una sustancia exógena o endógena (incluyendo macromoléculas, por ejemplo, proteínas o ácidos nucleicos) a una célula hospedadora. Esto tiene el efecto de hacer que el promotor diana presente en la célula hospedadora aumente la velocidad de transcripción. Como alternativa, el promotor empleado puede ser constitutivo. El término "constitutivo" utilizado en el contexto de un promotor significa que el promotor es capaz de dirigir la transcripción de una secuencia de nucleótidos unida operativamente en ausencia de estímulo (como choque térmico, productos químicos, etc.).

Los sistemas de inducción por temperatura funcionan, por ejemplo, empleando promotores que se reprimen mediante represores termolábiles. Estos represores son activos a temperaturas inferiores, por ejemplo, a 30 °C, mientras que son incapaces de plegarse correctamente a 37 °C y por tanto son inactivos. Por lo tanto, dichos circuitos pueden usarse para regular directamente los genes de interés (St-Pierre *et al.* 2013) también mediante integración genómica de los genes junto con los represores. Los ejemplos de estos, tales como un sistema de expresión inducible por temperatura, se basan en los promotores pL y/o pR de fago lambda, que están regulados por el represor cI857 termolábil. De manera similar al sistema DE3 integrado en el genoma, también puede controlarse la expresión del gen de ARN polimerasa T7 usando un sistema promotor regulado por temperatura (Mertens *et al.* 1995), mientras que la expresión de los genes de interés puede controlarse usando un promotor T7.

Los ejemplos no limitantes de promotores funcionales en bacterias, tales como *Escherichia coli*, incluyen promotores constitutivos e inducibles, tales como el promotor T7, los sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa; promotor

de fosfatasa alcalina (phoA), un sistema de promotor de triptófano (trp), promotor de tetraciclina, promotor del fago lambda, promotores de proteínas ribosómicas; y promotores híbridos, tales como el promotor tac. También son adecuados otros promotores bacterianos y sintéticos.

5 Además de un promotor, la molécula de ácido nucleico exógena puede comprender además al menos un elemento regulador seleccionado entre una región 5' no traducida (5'UTR) y una región 3' no traducida (3'UTR). Los expertos conocen bien muchas de estos 5' UTR y 3' UTR procedentes de procariotas y eucariotas. Dichos elementos reguladores incluyen 5' UTR y 3' UTR normalmente asociadas con otros genes y/o 5' UTR y 3' UTR aisladas de cualquier bacteria.

10 Normalmente, la 5' UTR contiene un sitio de unión al ribosoma (RBS), también conocido como la secuencia Shine Dalgarno, que generalmente tiene 3-10 pares de bases cadena arriba del codón de inicio.

15 La molécula de ácido nucleico exógena puede ser un vector o parte de un vector, tal como un vector de expresión. Normalmente, dicho vector se mantiene extracromosómico en la célula bacteriana, lo que significa que se encuentra fuera del núcleo o la región nucleóide de la bacteria.

20 En la presente invención también se contempla que la molécula de ácido nucleico exógena se integre de manera estable en el genoma de la bacteria. Los expertos en la materia conocen bien medios para la integración estable en el genoma de una célula hospedadora, por ejemplo, mediante recombinación de homólogos.

Una bacteria de acuerdo con la presente invención puede producirse a partir de cualquier bacteria adecuada que pertenezca a la familia *Enterobacteriaceae*.

25 Los ejemplos de bacterias que pueden usarse para obtener una bacteria de la invención son bacterias que pertenecen a un género seleccionado entre el grupo que consiste en *Escherichia*, *Arsenophonus*, *Biostraticola*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Cosenzaea*, *Cronobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Ewingella*, *Gibbsiella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Lonsdalea*, *Mangrovibacter*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phaseolibacter*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Saccharobacter*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia*, *Shimwellia*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Thorsellia*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Yersinia* y *Yokenella*.

30 De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria pertenece al género *Escherichia*. De acuerdo con realizaciones particulares, la bacteria es *Escherichia coli*. Los ejemplos no limitantes de una bacteria que pertenece al género *Escherichia*, que pueden usarse para obtener una bacteria de la invención, son *Escherichia coli* K-12 (especialmente la subcepa MG1655 o W3110), BL21, W o Crooks. De acuerdo con realizaciones más particulares, la bacteria es *Escherichia coli* K-12.

Método de la invención

40 La presente invención también proporciona métodos para producir L-serina o un derivado de L-serina usando una bacteria de acuerdo con la presente invención. En particular, la presente invención proporciona un método para producir L-serina o un derivado de L-serina, comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo.

45 De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir L-serina. En particular, la presente invención proporciona un método para producir L-serina, comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo. El método puede comprender además recoger la L-serina del medio de cultivo.

50 De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir un derivado de L-serina. En particular, la presente invención proporciona un método para producir un derivado de L-serina, comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo. El derivado de L-serina puede seleccionarse entre el grupo que consiste en L-cisteína, L-metionina, L-glicina, O-acetilserina, L-triptófano, tiamina, etanolamina y etilenglicol. El método puede comprender además recoger el derivado de L-serina del medio de cultivo.

55 De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir L-cisteína. En particular, la presente invención proporciona un método para producir L-cisteína, comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo. El método puede comprender además recoger la L-cisteína del medio de cultivo.

60 De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir L-metionina. En particular, la presente invención proporciona un método para producir L-metionina; comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo. El método puede comprender además recoger la L-metionina del medio de cultivo.

65

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir L-glicina. En particular, la presente invención proporciona un método para producir L-glicina; comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo. El método puede comprender además recoger la L-glicina del medio de cultivo.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir O-acetilserina. En particular, la presente invención proporciona un método para producir O-acetilserina; comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo. El método puede comprender además recoger la O-acetilserina del medio de cultivo.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir L-triptófano. En particular, la presente invención proporciona un método para producir L-triptófano; comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo. El método puede comprender además recoger el L-triptófano del medio de cultivo.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir tiamina. En particular, la presente invención proporciona un método para producir tiamina; comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo. El método puede comprender además recoger la tiamina del medio de cultivo.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir etanolamina. En particular, la presente invención proporciona un método para producir etanolamina; comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo. El método puede comprender además recoger la etanolamina del medio de cultivo.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir etilenglicol. En particular, la presente invención proporciona un método para producir etilenglicol; comprendiendo dicho método cultivar una bacteria como se detalla en el presente documento en un medio de cultivo. El método puede comprender además recoger el etilenglicol del medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar una célula bacteriana en cuestión y puede estar compuesto de acuerdo con los principios de la técnica anterior. El medio normalmente contendrá todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de la bacteria respectiva, tales como fuentes de carbono y nitrógeno y otras sales inorgánicas. Los medios adecuados, por ejemplo, medios mínimos o complejos, están disponibles de proveedores comerciales o pueden prepararse según las recetas publicadas, por ejemplo, el Catálogo de cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Un medio convencional no limitante bien conocido para el experto incluye caldo Luria Bertani (LB), caldo Sabouraud Dextrosa (SD), caldo MS, Levadura Peptona Dextrosa, BMMY, GMMY o caldo de extracto de levadura y malta (YM), que están disponibles comercialmente. Un ejemplo no limitante de medios adecuados para cultivar células bacterianas, tales como células de *E. coli*, incluye medios mínimos y medios enriquecidos, tales como caldo Luria (LB), medio M9, medio M17, medio SA, medio MOPS, Caldo Terrific, YT y otros.

Para aumentar adicionalmente la producción de L-serina o de derivado de L-serina, el medio de cultivo puede suplementarse adicionalmente con L-treonina. El medio de cultivo puede contener generalmente L-treonina a una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10 g/l, tal como de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,5 g/l, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 g/l o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 g/l. De acuerdo con ciertas realizaciones, el medio de cultivo contiene L-treonina a una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 g/l. De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, el medio de cultivo contiene L-treonina a una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,5 g/l. De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, el medio de cultivo contiene L-treonina a una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 g/l. De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, el medio de cultivo contiene L-treonina a una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 g/l. De acuerdo con ciertas realizaciones distintas, el medio de cultivo contiene L-treonina a una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 g/l. De acuerdo con otras realizaciones, el medio de cultivo contiene L-treonina a una concentración de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1 g/l.

La fuente de carbono puede ser cualquier sustrato de carbono adecuado conocido en la técnica y en particular, cualquier sustrato de carbono comúnmente usado en el cultivo de bacterias y/o fermentación. Los ejemplos no limitantes de sustratos de carbono fermentables adecuados son los azúcares C5 (tales como arabinosa o xilosa), los azúcares C6 (tales como glucosa), acetato, glicerol, aceites vegetales, extracto de levadura, peptona, casaminoácidos o mezclas de los mismos. Una fuente de carbono particularmente interesante es un azúcar C6, tal como glucosa.

Como fuente de nitrógeno, pueden usarse varias sales de amonio, tales como amoniaco y sulfato de amonio, otros compuestos de nitrógeno, tales como aminas, una fuente de nitrógeno natural, tal como peptona, hidrolizado de soja y un microorganismo fermentador digerido. Como minerales, pueden usarse monofosfato de potasio, sulfato de

magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, cloruro de calcio y similares.

El cultivo puede llevarse a cabo preferentemente en condiciones aerobias, tal como mediante cultivo agitado y mediante un cultivo agitado con aireación, a una temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 °C, tal como de aproximadamente 30 a 38 °C, preferentemente a aproximadamente 37 °C. El pH del cultivo normalmente es de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, tal como entre aproximadamente 6,5 y 7,5. El pH del cultivo puede ajustarse con amoniaco, carbonato de calcio, diversos ácidos, diversas bases y tampones. Normalmente, el cultivo de 1 a 5 días da lugar a la acumulación de L-serina en el medio de cultivo.

Después del cultivo, pueden retirarse del medio de cultivo los sólidos, tales como células, mediante centrifugación o filtración en membrana. La L-serina o el derivado de L-serina puede recogerse mediante un método convencional para el aislamiento y la purificación de compuestos químicos de un medio. Los métodos de purificación bien conocidos incluyen, pero sin limitación, centrifugación o filtración, precipitación, intercambio iónico, métodos cromatográficos, tales como, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de filtración en gel y métodos de cristalización.

La presente invención proporciona por tanto L-serina o un derivado de L-serina obtenible mediante un método como se detalla en el presente documento. Otras definiciones concretas

La expresión "bacteria que tiene la capacidad de producir L-serina", como se usa en el presente documento, significa una bacteria que es capaz de producir y provocar la acumulación de L-serina en un medio de cultivo, puede significar que la bacteria tiene la capacidad de causar la acumulación en una cantidad no menor de 0,4 g/l, cuando se cultiva en medio M9 mínimo suplementado con 2 g/l de glucosa, glicina 2 mM y treonina 1 mM a 37 °C con aireación adecuada durante 40 horas.

La frase "bacteria que se ha modificado para atenuar la expresión de genes que codifican polipéptidos que tienen actividad serina desaminasa", como se usa en el presente documento, significa que la bacteria se ha modificado de tal modo que la bacteria modificada contiene una cantidad reducida de los polipéptidos que tienen actividad serina desaminasa. Más particularmente, la frase significa que la bacteria es incapaz de sintetizar polipéptidos que tienen actividad serina desaminasa.

La frase "bacteria que se ha modificado para atenuar la expresión del gen que codifica un polipéptido que tiene actividad serina hidroximetiltransferasa", como se usa en el presente documento, significa que la bacteria se ha modificado de tal forma que la bacteria modificada contiene una cantidad reducida del polipéptido que tiene actividad serina hidroximetiltransferasa. Más particularmente, la frase significa que la bacteria es incapaz de sintetizar un polipéptido que tiene actividad serina hidroximetiltransferasa.

La frase "bacteria que se ha modificado para atenuar la expresión del gen que codifica un polipéptido que tiene actividad glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PDH)", como se usa en el presente documento, significa que la bacteria se ha modificado de tal forma que la bacteria modificada contiene una cantidad reducida del polipéptido que tiene actividad glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PDH). Más particularmente, la frase significa que la bacteria es incapaz de sintetizar un polipéptido que tiene actividad glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PDH).

La frase "inactivación de un gen" puede significar que el gen modificado codifica una proteína completamente no funcional. También es posible que la región de ADN modificada sea incapaz de expresar naturalmente el gen debido a la eliminación de una parte o de la totalidad de la secuencia génica, el desplazamiento del marco de lectura del gen, la introducción de mutaciones de sentido perdido/sin sentido o la modificación de una región adyacente del gen, incluyendo secuencias que controlan la expresión génica, tales como un promotor, potenciador, atenuador, sitio de unión a ribosomas, etc. Preferentemente, un gen de interés se inactiva mediante la eliminación de una parte de la secuencia génica completa, tal como mediante reemplazo génico.

La presencia o ausencia de un gen en el cromosoma de una bacteria puede detectarse mediante métodos bien conocidos, incluyendo PCR, transferencia de Southern y similares. Además, puede estimarse el nivel de expresión génica midiendo la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen usando varios métodos bien conocidos, incluyendo transferencia de Northern, RT-PCR cuantitativa y similares. La cantidad de proteína codificada por el gen puede medirse mediante métodos bien conocidos, incluyendo SDS-PAGE seguida de un ensayo de inmunotransferencia (análisis de transferencia de Western) y similares.

"Polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para indicar un polímero de al menos dos aminoácidos unidos covalentemente mediante un enlace de amida, independientemente de la longitud o de la modificación postraduccional (por ejemplo, glucosilación, fosforilación, lipidación, miristilación, ubiquitinación, etc.). Dentro de esta definición se incluyen D- y L-aminoácidos y mezclas de D- y L-aminoácidos.

"Ácido nucleico" o "polinucleótido" se usan indistintamente en este documento para indicar un polímero de al menos dos unidades o bases de monómero de ácido nucleico (por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timina) unidos covalentemente por un enlace fosfodiéster, independientemente de la longitud o la modificación de base.

- "Recombinante" o "de origen no natural" cuando se usa con referencia a, por ejemplo, una célula hospedadora, ácido nucleico o polipéptido, se refiere a un material o a un material correspondiente a la forma natural o nativa del material, que ha sido modificado de manera que de otro modo no existiría en la naturaleza o es idéntico a los mismos pero producido o derivado de materiales sintéticos y/o mediante manipulación usando técnicas recombinantes. Los ejemplos no limitantes incluyen, entre otros, células hospedadoras recombinantes que expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o que expresan genes nativos que de otro modo se expresan a un nivel diferente.
- "Heterólogo", como se usa en el presente documento, significa que un polipéptido normalmente no se encuentra o se produce (es decir, expresa) por el organismo hospedador, pero procede de una especie diferente.
- "Sustitución" o "sustituido" se refiere a la modificación del polipéptido reemplazando un resto de aminoácido con otro, por ejemplo, el reemplazo de un resto de serina con un resto de glicina o alanina en una secuencia de polipéptido es una sustitución de aminoácidos. Cuando se usa con referencia a un polinucleótido, "sustitución" o "sustituido" se refiere a la modificación del polinucleótido mediante el reemplazo de un nucleótido por otro, por ejemplo, el reemplazo de una citosina con una timina en una secuencia de polinucleótido es una sustitución de nucleótidos.
- "Sustitución conservativa", cuando se usa con referencia a un polipéptido, se refiere a una sustitución de un resto de aminoácido con un resto distinto que tiene una cadena lateral similar y por tanto, normalmente implica la sustitución del aminoácido en el polipéptido con aminoácidos de la misma clase de aminoácidos o una similar. A modo de ejemplo y no de limitación, un aminoácido con una cadena lateral alifática puede sustituirse con otro aminoácido alifático, por ejemplo, alanina, valina, leucina e isoleucina; un aminoácido con cadena lateral de hidroxilo se sustituye con otro aminoácido con una cadena lateral de hidroxilo, por ejemplo, serina y treonina; un aminoácido que tiene una cadena lateral aromática se sustituye con otro aminoácido que tiene una cadena lateral aromática, por ejemplo, fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina; un aminoácido con una cadena lateral básica se sustituye con otro aminoácido con una cadena lateral básica, por ejemplo, lisina y arginina; un aminoácido con una cadena lateral ácida se sustituye con otro aminoácido con una cadena lateral ácida, por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico; y un aminoácido hidrófobo o hidrófilo se reemplaza con otro aminoácido hidrófobo o hidrófilo, respectivamente.
- "Sustitución no conservativa", cuando se usa con referencia a un polipéptido, se refiere a una sustitución de un aminoácido en un polipéptido con un aminoácido con propiedades de cadena lateral significativamente diferentes. Las sustituciones no conservativas pueden usar aminoácidos entre, en lugar de dentro de, los grupos definidos y afecta a (a) la estructura de la cadena principal del péptido en el área de la sustitución (por ejemplo, serina por glicina), (b) la carga o la hidrofobia o (c) el volumen de la cadena lateral. A modo de ejemplo y no de limitación, una sustitución no conservativa a modo de ejemplo puede ser un aminoácido ácido sustituido con un aminoácido básico o alifático; un aminoácido aromático sustituido con un aminoácido pequeño; y un aminoácido hidrófilo sustituido con un aminoácido hidrófobo.
- "Eliminación" o "eliminado", cuando se usa con referencia a un polipéptido, se refiere a la modificación del polipéptido mediante la retirada de uno o más aminoácidos en el polipéptido de referencia. Las eliminaciones pueden comprender la retirada de 1 o más aminoácidos, 2 o más aminoácidos, 5 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos o 20 o más aminoácidos, hasta un 10 % del número total de aminoácidos o hasta un 20 % del número total de aminoácidos que forman el polipéptido, mientras que conserva la actividad enzimática y/o conserva las propiedades mejoradas de una enzima modificada por ingeniería genética. Las eliminaciones pueden estar dirigidas a las porciones internas y/o las porciones terminales del polipéptido, en diversas realizaciones, la eliminación puede comprender un segmento continuo o puede ser discontinua.
- "Inserción" o "insertado", cuando se usa con referencia a un polipéptido, se refiere a la modificación del polipéptido mediante la adición de uno o más aminoácidos en el polipéptido de referencia. Las inserciones pueden comprender la adición de 1 o más aminoácidos, 2 o más aminoácidos, 5 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos o 20 o más aminoácidos. Las inserciones pueden estar en las porciones internas del polipéptido o en el extremo carboxilo o amino. La inserción puede ser un segmento contiguo de aminoácidos o separado por uno o más de los aminoácidos en el polipéptido de referencia.
- La "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de un polipéptido (por ejemplo, enzima codificada) que incluye, pero sin limitación, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.
- Como se usa en el presente documento, "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra molécula de ácido nucleico a la que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ácido nucleico bicatenario en donde se pueden ligar segmentos adicionales de ácido nucleico. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. En el presente documento dichos vectores se denominan "vectores de expresión". Ciertos vectores diferentes tienen la capacidad de facilitar la inserción de una molécula de ácido nucleico exógena en un genoma de una bacteria. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de transformación". En general, los vectores útiles en las técnicas de

[<https://www.ebi.ac.uk/chebi/init.do>], por ejemplo, en la ID de ChEBI CHEBI:84135.

5 Cuando se indique un límite numérico o un intervalo en este documento, se incluyen los extremos. Asimismo, todos los valores y sub intervalos dentro de un límite numérico o intervalo se incluyen específicamente como si estuvieran escritos explícitamente.

Habiendo descrito generalmente la presente invención, se puede obtener una mayor comprensión haciendo referencia a ciertos ejemplos específicos, que se proporcionan en el presente documento solo con fines ilustrativos y no se pretende que sean limitantes, a menos que se especifique lo contrario.

10 Ejemplos

15 Por primera vez, los presentes inventores demuestran que puede producirse una bacteria, tal como *E. coli*, que carece de los cuatro genes de degradación de la serina (*sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA*) (ejemplo 1). Dicha cepa muestra mayor rendimiento de producción de serina que las variantes con supresiones génicas individuales y triples, cuando la vía de la serina está regulada positivamente (ejemplo 2). Sin embargo, la cepa resultante tenía baja tolerancia a la serina, lo que también se ha comunicado en una cepa de *E. coli* con triple eliminación que carece de *sdaA*, *sdaB* y *tdcG* (Zhang y Newman, 2008). Además, los inventores demuestran que puede reducirse la toxicidad del producto mediante la sobreexpresión de nuevos exportadores (ejemplo 3), evolucionando cepas mediante mutagénesis aleatoria (ejemplo 4) y mediante evolución adaptativa (ejemplo 5). Además, la cepa se modificó por ingeniería genética inversa para identificar las mutaciones causantes (ejemplo 6). Durante la fermentación discontinua, la cepa tolerante muestra producción de serina mejorada (12,6 g/l con un rendimiento de masa del 36,7 % a partir de glucosa) cuando se comparó con la cepa de cuádruple eliminación precursora (ejemplo 7). Este es el máximo rendimiento en masa de serina comunicado hasta la fecha a partir de glucosa en cualquier organismo de producción.

25 Los inventores demuestran además que la inhibición de la vía de pentosa fosfato mediante la eliminación de *zwf* en presencia de otras mutaciones causantes da lugar a un aumento adicional en el rendimiento de producción de serina (ejemplo 8).

30 Ejemplo 1 - Eliminación de vías de degradación clave

La serina tiene dos vías de degradación principales en *E. coli*: de serina a piruvato, que está codificada por tres desaminasas, a saber, *sdaA*, *sdaB* y *tdcG* y la conversión de serina a glicina, que está codificada por *glyA*. La eliminación de *glyA* hace que la *E. coli* sea auxótrofa para la glicina. La eliminación de *sdaA*, *sdaB* y *tdcG* se efectuó secuencialmente usando el método de reemplazo génico mediado por lambda red (Datsenko y Wanner, 2000). El protocolo aplicado para eliminar estos genes es similar al protocolo descrito por Sawitzke *et al.* (2013). Los cebadores para la amplificación del casete de kanamicina se muestran en la tabla S1. La reacción de la PCR contenía 250 nM de cada uno de los cebadores KF y KR del gen dado, 250 µM de mezcla de dNTP, 4 unidades de polimerasa Phusion (Thermoscientific, Waltham, MA, EE.UU.), 40 µl de tampón HF y 10 ng de plásmido pKD4. Se usó el siguiente protocolo de PCR en dos etapas para la amplificación por la PCR: Una etapa inicial de desnaturalización a 98 °C durante 40 segundos, seguida de 5 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 90 segundos cada ciclo, seguido de 20 ciclos, donde se aumentó la temperatura de hibridación de 55 °C a 65 °C. Los productos de la PCR se purificaron en columna (Macherey Nagel, Durn, Alemania) y se midió la concentración usando un instrumento Nanodrop (Thermoscientific, Waltham, MA, EE. UU.) y se sometió a digestión con DpnI durante una noche. Se usó *E. coli* MG1655 como cepa precursora para producir supresiones génicas secuenciales. La cepa precursora se transformó con pKD46 y se cultivó en medio 2YT-amp a 30 °C y 250 rpm. Se indujo la expresión de las proteínas exo, beta y gamma mediante la adición de arabinosa 20 mM a la mitad de la fase logarítmica (D.O. 0,4 a 0,5) y las células se recogieron después de 1 h de incubación adicional. Después, se transfirió el cultivo a tubos Falcon enfriados en hielo de 50 ml y se centrifugaron a 6500 rpm durante 5 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con glicerol al 10 % enfriado en hielo. Estas células electrocompetentes se transformaron con 200 ng de casete de kanamicina y los transformantes se sembraron en placas de LB-kan. Se retiró el casete de kanamicina usando el plásmido pcp20 que codifica el gen de flipasa. Los cebadores para comprobar la eliminación se muestran en la tabla S2. La serina hidroximetiltransferasa codificada por *glyA* se retiró usando el protocolo del sistema de fago P1 (Thomason *et al.*, 2007). Se cultivó una cepa de la colección Keio (Baba *et al.*, 2006) que portaba *glyA::kan* en 5 ml de medio λ LB-kan suplementado con glucosa al 0,2 %, CaCl₂ 25 mM y glicina 1 mM. En la fase logarítmica temprana (D.O. 0,1), el cultivo se transdujo con lisado de fago P1. El cultivo se incubó durante tres horas a 37 °C y a 250 rpm para la lisis celular. El lisado se esterilizó por filtración usando un filtro de 0,45 µm. Se resuspendió 1 ml de cultivo de una noche de la cepa de *E. coli* que tenía eliminación de *sdaA*, *sdaB* y *tdcG* en 200 µl de solución salina P1 y se incubó con 100 µl del lisado anterior durante 1 h. Después, se cultivaron las células durante una noche en 2 ml de medio LB suplementado con glicina 2 mM y citrato de sodio 200 mM. Las células se sembraron en una placa de LB-kan suplementado con glicina 2 mM y citrato de sodio 10 mM. Los clones se volvieron a sembrar en estrías en una nueva placa para retirar cualquier contaminación por fago y se comprobó la inserción del casete en las colonias aisladas. La eliminación se efectuó usando plásmido pcp20. La cepa resultante con cuádruple eliminación (figura 1) se denomina Q1. Este ejemplo demuestra que es posible eliminar *sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA* en *E. coli*, algo que no se había logrado anteriormente y por tanto, es inesperado.

Tabla S1: Cebadores usados para la amplificación del casete de kanamicina

Nombre del cebador	Secuencia
sdaA_KF	GCGCTGTTATTAGTTCGTTACTGGAAGTCCAGTCACCTTGTCAGGAGTATTATCGTGGTGTAG GCTGGAGCTGCTTCG
sdaA_KR	CGCCCATCCGTTGCAGATGGGCGAGTAAGAAGTATTAGTCACACTGGACCATATGAATATCC TCCTTAGTTCC
sdaB_KF	CGCTTTCGGGCGGCGCTTCCTCCGTTTTAACGCGATGTATTTCTATGGTGTAGGCTGGAGCT GCTTCG
sdaB_KR	GGCCTCGCAAACGAGGCCTTTGGAGAGCGATTAATCGCAGGCAACCATATGAATATCCTCC TTAGTTCC
tdcG_KF	CGTTCCGCTCCACTTCACTGAACGGCAATCCGAGGGTGTGGATATGGTGTAGGCTGGAGCTG CTTCG
tdcG_KR	GTGCACCCAAGGATGAAAGCTGACAGCAATGTCAGCCGAGACCACCATATGAATATCCTCC TTAGTTCC
glyA_KF	GTTAGCTGAGTCAGGAGATGCGGATGTTAAAGCGTCAAATGAACATTGCCGTGTAGGCTGG AGCTGCTTCG
glyA_KR	CAACGAGCACATTGACAGCAAATCACCGTTTCGCTTATGCGTAAACCGGCATATGAATATCCT CCTTAGTTCC

Tabla S2: Cebadores usados para comprobar la eliminación de genes específicos

Nombre del cebador	Secuencia
sdaA_cF	GCGCTGTTATTAGTTCGTTACTGGAAGTCC
sdaA_cR	CGCCCATCCGTTGCAGATGGGC
sdaB_cF	CGCTTTCGGGCGGCGCTTCCTC
sdaB_cR	GGCCTCGCAAACGAGGCCTTTGG
tdcG_cF	CGTTCCGCTCCACTTCACTGAACGG
tdcG_cR	GTGCACCCAAGGATGAAAGCTGACAGC
glyA_cF	GTTAGCTGAGTCAGGAGATGCGGATGTT
glyA_cR	CAACGAGCACATTGACAGCAAATCACCG

5 Ejemplo 2 - Sobreexpresión de la vía de biosíntesis de serina para la producción de serina

La serina se produce en *E. coli* a partir de tres enzimas codificadas por *serA*, *serB* y *serC*. Todos los genes se aislaron de *E. coli* MG1655 usando cebadores con los nombres de gen respectivos (tabla S3). La mezcla de la PCR de 100 μ l contiene 250 nM de cada uno del cebador directo e inverso, 250 μ M de dNTP, 2 U de polimerasa Phusion, 1 X tampón HF, 1 μ l de cultivo de una noche. Se usó el siguiente protocolo de PCR en dos etapas para la amplificación por la PCR: Una etapa inicial de desnaturalización a 98 °C durante 40, seguida de 5 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 90 segundos cada ciclo, seguido de 20 ciclos, donde se aumentó la temperatura de hibridación de 55 °C a 65 °C. Después de la purificación en columna, se digirieron los productos génicos y los plásmidos usando enzimas de digestión rápida (Thermoscientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se sometieron aproximadamente 500 ng de producto de la PCR o 1 μ g de plásmidos a digestión mediante 1 μ l de cada una de las enzimas de restricción en tampón de digestión rápida 1X. La reacción se incubó durante 3h y después se purificó en columna nuevamente. Se sometió *serA* a doble digestión con NcoI y NotI mientras que *serC* se digirió con NdeI y PaeI. pCDF-Duet se digirió en primer lugar con NcoI y NotI para la clonación de *serA*, dando lugar al plásmido pCDF-Duet-*serA* y este plásmido se usó posteriormente para la clonación de *serC*, produciendo de este modo pCDF-Duet-*serA-serC*. El gen que codifica *serB* se clonó en el vector pACYC-Duet en el sitio de NcoI y PaeI, dando lugar a pACYC-*serB*. La reacción de ligamiento típica incluye tampón de ligasa T4 1 X, 50 ng de ADN plasmídico y 100 ng de inserto y 0,3 μ l/10 μ l de ADN ligasa de T4 (Thermoscientific, Waltham, MA, EE.UU.).

La inhibición por retroalimentación de *serA* se retiró mutando tres restos, H344, N346 y N364 a alanina (Al-Rabeee *et al.*, 1996) mediante mutagénesis dirigida al sitio (tabla S4). La mezcla maestra se usó como se ha mencionado anteriormente con la única modificación de que la mezcla maestra se dividió en dos alícuotas iguales, tras lo cual se añadieron cebadores directos e inversos a cada alícuota. Se usó como molde un total de 100 ng de plásmido pCDF-Duet-*serA-serC*. El programa de PCR en dos etapas: desnaturalización inicial a 98 °C durante 40 s, desnaturalización a 98 °C durante 10 s, hibridación a 60 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 4 min y 30 s se repitió 5 veces y después se mezclaron las dos alícuotas y se redistribuyeron para 15 ciclos adicionales. Para permitir el intercambio de las cadenas principales del vector, se retiró el sitio de NcoI dentro de *serC* con la misma estrategia usando los cebadores listados en la tabla S4.

La figura 2 muestra los mapas de vectores de las construcciones de plásmido.

Tabla S3: Cebadores usados para la amplificación y clonación de la vía de producción de serina

Nombre del cebador	Secuencia
serA-NcoI	GGCCCATGGCAAAGGTATCGCTGGAG
serA NotI_R	ATTGCGGCCGCTTAGTACAGCAGACGGGCGCGA
serB_NcoI_F	GGCCCATGGCTAACATTACCTGGTGCG
serB_R_HindIII	GCCAAGCTT TTATTACTTCTGATTCAGGCTGCC
serB_PacI_R	GCCTTAATTAATTATTACTTCTGATTCAGGCTGCC
serC_F_NdeI	GGCCATATGATGGCTCAAATCTTCAATTTTAGTTCTGG
serC_R_PacI	GCCTTAATTAATCAT TAACCGTGACGGCGTTTCAAC
ydeD_F_NdeI	CCGCATATGTCGCGAAAAGATGGGGTG
ydeD_cHis_R-PacI	GCCTTAATTAATGATGATGATGATGATGACTTC CCACCT TTACCGCTT TACGCC
ydeD_NcoI_F1	CCGCCATGGCGCGAAAAGATGGGGTG

Tabla S4: Cebadores usados para la mutagénesis dirigida al sitio de la vía de producción de serina

Nombre del cebador	Secuencia
serA N364A_F	CGAGCAGGGCGTCGCTATCGCCGCGCAATA
serA N364A_R	TATTGCGCGGCGATAGCGACGCCCTGCTCG
serA H344AN346A_F	CTGAT CACATCGCTGAAGCT CGTCCGGGCGTGCG
serA H344AN346A_R	GCACGCCCCGACGAGCTTCAGCGATGTGCATCAG
serC_NcoIc_F	CAAGGTATTATTCTGTCATGGCGGTGGTTCGCG
serC_NcoIc_R	CGCGACCACCGCCATGACAGAATAATACCTTG

Integración de DE3 y producción de serina durante la fermentación discontinua

Se comprobó la producción de serina en medio M9 mínimo. El medio mínimo glucosa M9 consistía en 2 g/l de glucosa, CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 2,0 mM, solución de oligoelementos 1 x y sales M9 1x. La solución madre de oligoelementos 4.000x consistía en 27 g/l de FeCl₃*6H₂O, 2 g/l de ZnCl₂*4H₂O, 2 g/l de CoCl₂*6H₂O, 2 g/l de NaMoO₄*2H₂O, 1 g/l de CaCl₂*H₂O, 1,3 g/l de CuCl₂*6H₂O, 0,5 g/l de H₃BO₃ y HCl concentrado disuelto en ddH₂O y esterilizado por filtración. La solución madre de sales M9 10x consistía en 68 g/l de Na₂HPO₄ anhidro, 30 g/l de KH₂PO₄, 5 g/l de NaCl y 10 g/l de NH₄Cl disuelto en ddH₂O y autoclavada.

Para usar vectores pET como sistema de expresión, se integró un casete de DE3 que contenía polimerasa T7 en el genoma de cada mutante de eliminación usando un kit de lisogenización de DE3 Lambda (Millipore, Damstadt, Alemania). Posteriormente, se transformaron cepas (MG1655 (DE3)) que portaban eliminaciones individuales (*ΔsdaA*), triples (*ΔsdaA*, *ΔtdcG*, *ΔsdaB*) y cuádruples (*ΔsdaA*, *ΔtdcG*, *ΔsdaB* y *ΔglyA*) con pCDF-Duet1-*serA*mut-*serC* y pACYC-*serB*. Las soluciones madre de glicerol resultantes se cultivaron durante una noche en medio 2YT que contenía glucosa al 0,1 % y suplementado con los antibióticos necesarios (espectinomicina y cloranfenicol). Los cultivos de una noche se inocularon en triplicados en matraces que contenían medio M9 suplementado con glucosa al 0,2 %, treonina 1 mM, los antibióticos necesarios (para la cepa de cuádruple eliminación, solo se suplementó con glicina 2 mM). Los matraces se incubaron a 37 °C a 250 rpm. La producción de serina se indujo mediante la adición

de IPTG 40 μM después de que los cultivos alcanzasen una densidad óptica de 0,55 a 0,65. Las mediciones de D.O. y la toma de muestras se efectuaron a intervalos de tiempo regulares durante las 60 h siguientes. Las muestras se filtraron y sometieron a HPLC para el análisis de la glucosa y los subproductos usando un método anteriormente descrito (Kildegaard *et al.*, 2014) con la única excepción de que la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C.

5 Las concentraciones de serina se determinaron usando CLEM. El sistema de CL-EM/EM consistía en un módulo automuestreador CTC, una bomba de mezclado a alta presión y un módulo de columna (Advance, Bruker, Fremont, CA, EE.UU.). El volumen de inyección fue de 1 μl . La cromatografía se llevó a cabo en una columna ZIC-cHILIC, 150 mm x 2,1 mm, tamaño de poro de 3 μm , (SeQuant, Merck Millipore). Delante de la columna de separación había un filtro de profundidad de 0,5 μm y una columna de guarda, el filtro (KrudKatcher Classic, Phenomenex) y columna de guarda ZIC-cHILIC, 20 x2,1 mm (SeQuant, Merck). Eluyente A: acetato de amonio 20 mM con pH ajustado a 3,5 con ácido fórmico en agua milliQ. Eluyente B: Acetonitrilo. El caudal total del eluyente A y B fue de 0,4 ml/min. La elución isocrática al 35 % y el tiempo total de ejecución fue de 5 minutos. El tiempo de retención fue de 2,8 minutos para la serina. La detección por EM-EM se llevó a cabo en un instrumento de triple cuadrupolo EVOQ (Bruker, California, EE. UU.) equipado con una interfaz de ionización a presión atmosférica (API). El espectrómetro de masas se empleó con electronebulización en el modo de ion positivo (IEN+). El voltaje de nebulización se ajustó a 4500 V. El flujo continuo de gas fue de 20 l/h y la temperatura del cono se ajustó a 350 °C. El flujo de gas de la sonda calentada se ajustó a 50 l/h con una temperatura de 350 °C. El caudal del nebulizador se ajustó a 50 l/h y se activó el gas de escape. Se usó argón como gas de colisión a una presión de 1,5 mTorr. La detección se llevó a cabo en el modo de monitorización de reacción múltiple (MRM). La transición cuantitativa fue de 106 \rightarrow 60 y la transición cualitativa fue 106 \rightarrow 70. La energía de colisión se optimizó a 7eV para ambas transiciones.

Se prepararon patrones de calibración de serina en los medios usados para la producción de serina y se diluyeron a 50:50 con ácido fórmico al 0,2 % en acetonitrilo. La concentración de los patrones de calibración se encontraba en el intervalo de 0,001 a 0,5 g/l.

25 El experimento demuestra que la eliminación de los cuatro genes implicados en la degradación de la serina en *E. coli*, citada como Q1(DE3), da como resultado la máxima productividad específica y el máximo rendimiento a partir de glucosa, como se muestra en la figura 3.

30 **Ejemplo 3: Reducción de la toxicidad de producto mediante la sobreexpresión de transportador**

La eliminación de las principales vías de degradación de la serina en *E. coli* da como resultado una tolerancia significativamente reducida a la serina. Para aumentar la tolerancia, se sobreexpresó un transportador con una especificidad potencial por serina (*ydeD*) y se evaluó durante el crecimiento en altas concentraciones de serina. Se clonó *ydeD* en pCDF-1b en los sitios de NcoI y PaeI mediante amplificación con los cebadores mencionados en la tabla S3 y el protocolo proporcionado en el ejemplo 1.

40 Se transformó Q1(DE3) con el vector vacío pCDF-1b y el plásmido de pCDF-*ydeD*-c-His (figura 4). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB-espectinomicina. Los cultivos de una noche de estos transformantes se inocularon en medio M9 suplementado con glicina 2 mM, 2 g/l de glucosa y espectinomicina a una relación 1:50. Los cultivos se inocularon a 37 °C a 250 rpm a una densidad óptica de 0,4 a 0,5, tras lo cual se añadieron 800 μl a una placa de Biolector de 48 pocillos (M2P labs, Baeswieler, Alemania) que contenía 800 μl de medio M9 con diversas concentraciones de serina (12,5, 25 y 50 g/l) y glicina 2 mM. La expresión de *ydeD* se indujo con IPTG 100 μM . Después, se monitorizó el crecimiento en el instrumento Biolector (M2P labs, Baeswieler, Alemania) a 37 °C y una humedad del 70 % con agitación continua. La ganancia se ajustó al 20 % y la intensidad de dispersión se midió cada 5 min durante las 40 h siguientes.

50 El experimento demuestra que el crecimiento de *E. coli* que carece de las principales vías de degradación de serina está gravemente inhibido en presencia de concentraciones incluso bajas de serina. Tras la sobreexpresión de *ydeD*, aumenta sustancialmente la tolerancia a la serina (figura 4), lo que sugiere que *YdeD* puede potencialmente transportar la serina fuera de la célula.

Ejemplo 4 - Mutagénesis aleatoria para la cepa tolerante a serina

55 La inactivación de las principales vías de degradación de la serina en *E. coli* da como resultado una tolerancia significativamente reducida a la serina. Para aumentar la tolerancia, se cultivó la cepa Q1 (obtenida en el ejemplo 1) en medio M9 suplementado con glicina 2 mM y 3 g/l de serina durante una noche. Se dispersó 1 ml de cultivo en una placa de Petri de 6 pocillos y se expuso a irradiación UV (CBS Scientific, San Diego, CA, EE. UU.) durante 30 min. Después, se añadieron al cultivo 5 ml de medio M9 suplementado con glicina 2 mM, 2 g/l de glucosa y 50 g/l de serina para el enriquecimiento de los mutantes tolerantes. El cultivo se incubó a 37 °C y 250 rpm durante 3 días y después se sembraron en la placa de M9 suplementado con 50 g/l de serina para la selección de los clones tolerantes. Las colonias se aislaron y se estimaron las velocidades de crecimiento y la tolerancia usando el siguiente método:

65 Los cultivos se cultivaron durante una noche en medio 2xYT. Después, se inocularon en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos con 150 μl de medio M9 que contenía glucosa al 0,2 % y diversas concentraciones de serina (en triplicados). Para las cepas que contenían la eliminación de *glyA*, también se suplementó glicina 2 mM en el medio.

Se usó como inóculo un total de 1,5 µl de células (1:100). En caso necesario, se efectuaron cambios menores en el volumen para asegurar una cantidad igual de células. Las placas se sellaron con película adhesiva transparente Microamp (Applied Biosystems, Warrington, R. U.) y se incubaron en un lector de placas de microtitulación (Biotek, Winooski VT, EE. UU.). El lector se ajustó a 37 °C con agitación continua y se monitorizó la D.O. cada 5 a 10 minutos a 630 nm durante 32 horas.

El experimento demuestra que puede usarse mutagénesis aleatoria para aumentar significativamente la tolerancia a la serina (figura 5). La cepa resultante se cita a continuación como Q3.

10 Ejemplo 5 - Evolución adaptativa para la tolerancia a la L-serina

Aparte de la mutagénesis aleatoria, también se aumentó la tolerancia a la serina de una cepa que tenía inactivadas las principales vías de degradación de la serina mediante evolución adaptativa. Se evolucionaron de manera adaptativa siete poblaciones independientes de la cepa Q1 en medio mínimo M9 suplementado con glicina 2 mM y concentraciones crecientes del aminoácido L-serina a 37 °C a lo largo de 60 días.

Se logró un experimento de evolución adaptativa en laboratorio (ALE) usando un sistema automatizado, lo que permite la propagación de poblaciones en evolución a lo largo del transcurso de varios días mientras se monitorizan sus velocidades de crecimiento. Antes de iniciar el experimento, el sistema rellena los tubos necesarios con 25 ml de medio de cultivo y los mantiene a 37 °C en un bloque de calentamiento. Se obtuvo aireación controlada usando agitadores por volteo magnéticos dentro de los tubos y centrifugando a 1.800 rpm. Al comienzo del experimento, se cultivó durante una noche una sola colonia en uno de los tubos colocados dentro del sistema y se usaron alícuotas de 100 µl por la plataforma robotizada para inocular siete matraces independientes. A medida que crecieron las bacterias, el sistema automatizado llevó a cabo múltiples medidas de DO a 600 nm para cada matraz. Las velocidades de crecimiento se calcularon automáticamente tomando la pendiente de un ajuste lineal de regresión lineal de mínimos cuadrados al logaritmo de las mediciones de la DO (figura 6). Una vez que se alcanza una DO diana de 0,4, se usaron 100 µl de cultivo para inocular un nuevo matraz. De esta forma, los cultivos se pasaron en serie (~2-3 veces al día) a matraces con medio fresco después de alcanzar una densidad celular diana, de tal forma que nunca se alcanzó la fase estacionaria. Las poblaciones se incubaron inicialmente con 3 g/l de serina. Después de alcanzarse la velocidad de crecimiento deseada, el cultivo se suplementó con 6 g/l de L-serina. Cuando las poblaciones lograron un fenotipo estable (es decir, velocidad de crecimiento), se aumentó la concentración de L-serina hasta 12 g/l. Este proceso se repitió de manera iterativa usando 24, 50, 75 y 100 g/l de L-serina. La población final se sembró en LB-agar y se seleccionaron 2 clones de cada una de las poblaciones. Las cepas evolucionadas tenían una tolerancia significativamente aumentada cuando se evaluó su crecimiento en presencia de altas concentraciones de serina usando el ensayo basado en MTP descrito en el ejemplo 5, anterior. Los resultados se muestran en la figura 6.

Extracción de ADN genómico, secuenciación y análisis de bibliotecas

Se secuenció el genoma de dos clones de cada uno de los cultivos evolucionados, así como de la cepa evolucionada mediante mutagénesis UV aleatoria (ejemplo 5). El ADN genómico se extrajo a partir de 1,5 ml de cultivos de una noche de cepas de *E. coli* usando el kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Alemania). Las bibliotecas genómicas se generaron usando el kit de preparación de muestras TruSeq® Nano DNA LT (Illumina Inc., San Diego CA, EE. UU.). En resumen, se fragmentaron 100 ng de ADN genómico diluido en 52,5 µl de tampón TE en microtubos Covaris Crimp Cap en un dispositivo de ultrasonidos Covaris E220 (Covaris, Brighton, R. U.) con un factor de trabajo del 5 %, potencia incidente máxima de 175 W, 200 ciclos/ráfaga y una duración de 50 s en modo de barrido de frecuencia a de 5,5 a 6 °C (recomendaciones de Illumina para un tamaño de fragmento medio de 350 pb). Los extremos del ADN fragmentado se repararon mediante ADN polimerasa T4, ADN polimerasa Klenow y polinucleótido cinasa T4. Después, se usó la enzima Klenow exo minus para añadir una base de "A" al extremo 3' de los fragmentos de ADN. Después del ligamiento de los adaptadores a los extremos de los fragmentos de ADN, se recuperaron fragmentos de ADN en el intervalo de 300-400 pb mediante purificación con perlas. Finalmente, se enriquecieron los fragmentos de ADN modificados con adaptador mediante PCR de 3 ciclos. La concentración final de cada biblioteca se midió mediante un fluorómetro Qubit® 2.0 y un ensayo de ADN de amplio espectro Qubit (Life Technologies, Paisley, R. U.). Se determinó el tamaño medio de la biblioteca de ADNbc usando el kit Agilent DNA 7500 en un bioanalizador Agilent 2100. Las bibliotecas se normalizaron y agruparon en Tris-Cl 10 mM, pH 8,0, más Tween 20 al 0,05 % a la concentración final de 10 nM. Desnaturalizadas en NaOH 0,2N, se cargó un grupo 10 pM de 20 bibliotecas en 600 µl de tampón HT1 enfriado en hielo en la celda de flujo proporcionada en el kit de reactivo MiSeq v2 durante 300 ciclos y se secuenció en una plataforma MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EE. UU.) con un protocolo de extremos emparejados y longitudes de lectura de 151 nt.

Se usó Breseq Pipeline (Deatherage y Barrick, 2014) versión 0.23 con bowtie2 (Langmead y Salzberg) para mapear las lecturas de secuenciación e identificar variantes de secuencia en relación con el genoma de referencia de *E. coli* K12 MG1655 (n.º de referencia del NCBI NC_000913.2). Las eliminaciones génicas presentes en las cepas se verificaron manualmente en las regiones de cobertura ausentes en el genoma. Las variantes comunes halladas en cultivos madre de MG1655 (Freddolino *et al.*, 2012) se excluyeron de los análisis posteriores. Todas las muestras de secuenciación tenían una cobertura media mapeada de al menos 25x. Este experimento identifica mutaciones que provocan tolerancia aumentada a altas concentraciones de serina, como se muestra en la tabla S5.

Tabla S5: Mutaciones halladas en las cepas evolucionadas para tolerancia aumentada a la serina. El número de referencia para la secuencia genómica es NC_000913.

Nombre del gen	Cambio	Anotación	Q1	Q3	ALE5-4	ALE5-8	ALE6-1	ALE6-2
thrA	A->G	Y356C	0	0	0	0	0	0
thrA	A->C	S357R	0	0	1	1	0	0
thrA	T->A	S359R	0	0	0	0	1	1
trxA/rho	IS1 -1 9 pb	Inserción ¹	0	0	0	0	0	0
rho	G->T	R87L	0	0	0	0	1	1
gcvA/ygdI	1 pb	Inserción ²	0	0	0	0	1	1
gcvA/ygdI	IS4 1 13 pb	Inserción ³	0	0	1	1	0	0
dapA/gcvR	1 pb	Inserción ⁴	0	0	1	0	1	1
lrp	A->G	D143G	0	0	0	0	0	0
trxB/lrp	C->T	Intergénica ⁹ (-271/-274)	0	0	0	0	1	1
frc	IS1 -1 9 pb	Inserción ⁵	0	0	0	0	0	0
eno	C->G	V164L	0	0	0	0	0	0
argP	C->A	Q132K	0	0	0	0	0	0
tufA	C->A	G19V	0	0	0	0	0	0
cycA	A->G	I220V	0	0	0	0	0	0
rhtA/ompX/ybiP/mntS	2854 pb	Eliminación ⁶	0	1	0	0	0	0
rpe	A->G	I202T	0	0	0	0	1	1
ytfB/fkIB	T->C	Intergénica ¹⁰ (-154/-64)	0	0	0	0	1	1
yojL	G->C	D334H	0	0	0	0	1	0
aroP	IS5 1 4 pb	Inserción ⁷	0	0	1	1	0	0
hyaF	T->G	V120G	0	0	1	1	0	0
mdtJ/tqsA	IS1 -1 9 pb	Inserción ⁸	0	0	0	0	0	0
pykF	G->T	E250*	0	0	1	1	0	0
malT	C->T	Q420*	0	0	1	1	0	0
rpoB	C->T	P520L	0	0	1	1	0	0
fumB	T->G	T218P	0	0	0	0	0	0
gshA	G->A	A178V	0	0	0	1	0	0
lamB	C->T	Q112*	0	0	0	1	0	0
Nombre del gen	Cambio	Anotación	Q1	ALE8-3	ALE8-8	ALE9-3	ALE9-8	
thrA	A->G	Y356C	0	1	1	1	1	
thrA	A->C	S357R	0	0	0	0	0	
thrA	T->A	S359R	0	0	0	0	0	
trxA/rho	IS1 -1 9 pb	Inserción ¹	0	1	1	1	1	
rho	G->T	R87L	0	0	0	0	0	
gcvA/ygdI	1 pb	Inserción ²	0	0	0	0	0	
gcvA/ygdI	IS4 1 13 pb	Inserción ³	0	0	0	0	0	
dapA/gcvR	1 pb	Inserción ⁴	0	0	0	0	0	
lrp	A->G	D143G	0	1	1	1	1	
trxB/lrp	C->T	Intergénica ⁹ (-271/-274)	0	0	0	0	0	
frc	IS1 -1 9 pb	Inserción ⁵	0	1	1	1	1	

(continuación)

Nombre del gen	Cambio	Anotación	Q1	ALE8-3	ALE8-8	ALE9-3	ALE9-8	
eno	C->G	V164L	0	1	1	1	1	
argP	C->A	Q132K	0	1	1	1	1	
tufA	C->A	G19V	0	1	1	1	1	
cycA	A->G	1220V	0	1	1	1	1	
rhtA/ompX/ybiP/mntS	2854 pb	Eliminación ⁶	0	0	0	0	0	
rpe	A->G	I202T	0	0	0	0	0	
ytfB/fkIB	T->C	Intergénica ¹⁰ (-154/-64)	0	0	0	0	0	
yojI	G->C	D334H	0	0	0	0	0	
aroP	IS5 14 pb	Inserción ⁷	0	0	0	0	0	
hyaF	T->G	V120G	0	0	0	0	0	
mdtJ/tqsA	IS1 -1 9 pb	Inserción ⁸	0	0	0	0	1	
pykF	G->T	E250*	0	0	0	0	0	
malT	C->T	Q420*	0	0	0	0	0	
rpoB	C->T	P520L	0	0	0	0	0	
fumB	T->G	T218P	0	0	0	1	0	
gshA	G->A	A178V	0	0	0	0	0	
lamB	C->T	Q112*	0	0	0	0	0	

*: indica un codón de parada

- 5 Inserción¹: Inserción de un elemento de secuencia de inserción IS1 de 768 pb de longitud en la hebra retardada en la ubicación 3966174, que es una región intergénica entre los genes *trxA* y *rho*. Se observa una duplicación de 9 pb cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de inserción.
- 10 Inserción²: Inserción de 1 pb en la ubicación 2942629, que es una región intergénica entre los genes *gcvA* e *ygdl*.
- Inserción³: Inserción de un elemento de secuencia de inserción IS4 de 1342 pb en la ubicación 2942878, que es una región intergénica entre los genes *gcvA* e *ygdl*. Se observa una duplicación de aproximadamente 13 pb cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de inserción.
- 15 Inserción⁴: Inserción de 1 pb en la ubicación 2599854, que es una región intergénica entre los genes *dapA* y *gcvR*.
- Inserción⁵: Inserción de un elemento de secuencia de inserción IS1 de 768 pb de longitud en la hebra retardada en la ubicación 2492323, que da lugar a un truncamiento del gen *frc*. Se observa una duplicación de 9 pb cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de inserción.
- 20 Eliminación⁶: Eliminación de 2854 pb de la ubicación 850092, que da como resultado la eliminación de los primeros 5 pb de *rhtA*, eliminación completa de los genes *ompX* e *ybiP*, eliminación de 239 pb del gen *rybA* y eliminación de 77 pb del gen *mntS*.
- 25 Inserción⁷: Inserción de un elemento de secuencia de inserción IS5 de 1195 pb de longitud en la ubicación 121518 que da lugar a la eliminación de la mayoría de *aroP*. Se observa una duplicación de 4 pb cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de inserción.
- 30 Inserción⁸: Inserción de un elemento de secuencia de inserción IS1 de 768 pb de longitud en la hebra retardada en la ubicación 1673670, que es una región intergénica entre los genes *mdtJ* y *tqsA*. Se observa una duplicación de 9 pb cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de inserción.
- Intergénica⁹: mutación C->T en la ubicación 923321 que es una región intergénica entre *trxB* e *Irp*. La mutación se encuentra a 271 pb cadena arriba de *trxB* y a 274 pb cadena arriba de *Irp*.
- 35 Intergénica¹⁰: mutación T-> C en la ubicación 4428871 que es una región intergénica entre *ytfB* y *fkIB*. La mutación se encuentra a 154 pb cadena arriba de *ytfB* y a 64 pb cadena arriba de *fkIB*.

40 Ejemplo 6 - Ingeniería inversa de mutaciones de ALE mediante el sistema cam-scB e ingeniería genómica multiplexada

Para identificar mutaciones que provocan tolerancia aumentada a la serina, se introdujeron mutaciones identificadas en el ejemplo 5 en la cepa Q1(DE3) usando dos métodos diferentes como se describe a continuación.

5 A. Introducción de mutaciones de *thrA*

Se introdujeron mutaciones en *thrA* en el genoma de la cepa Q1(DE3) usando un sistema de selección basado en cam-sacB. Se insertó cam-sacB usando el plásmido pKD46 que portaba los genes *exo*, *beta* y *gamma* para la recombinación. La selección positiva para la inserción del casete se efectuó seleccionando clones por su resistencia al cloranfenicol. La pérdida del casete se seleccionó emplacing clones por duplicado en una placa de LB-cloranfenicol y LB-sacarosa que contenía sacarosa al 15 % (sin NaCl). El casete de cam-sacB se amplificó usando los cebadores *thrA_camsacB_F* y *R* (tabla S6), respectivamente. Aparte del molde y el tiempo de extensión, la mezcla de reacción y el programa de la PCR fue el mismo al descrito en el ejemplo 1. El tiempo de extensión fue de 2 min y 30 s, mientras que el molde fue 1 µl de cultivo de una noche del cultivo de *E. coli* que contenía el casete de cam-sacB. Después, se transformaron células Q1(DE3) competentes con 200 ng de casete *thrA-cam-sacB* y se emplacearon en placas de LB-cloranfenicol-ampicilina después de dos horas y se incubaron durante una noche a 30 °C. Se recogió una sola colonia y se hizo electrocompetente después de 1 h de inducción (ejemplo 1) y se transformó con alelos de *thrA*. Después de 2 horas de recuperación, las células se sembraron en placas de LB-sacarosa y se incubaron a 37 °C para curar el plásmido pKD46. Se sembraron por duplicado 24 clones de cada experimento en placas de LB-cloranfenicol y LB. Se comprobó la pérdida del casete de los clones que no crecieron en las placas de cloranfenicol mediante PCR de colonias y posteriormente se secuenciaron mediante secuenciación de Sanger.

Las tres cepas que contenían mutaciones de *thrA* (Y356C, S357R o S359R) se cultivaron en medio M9 suplementado con glicina 2 mM, 2 g/l de glucosa y 6,25 g/l de L-serina. En este experimento, no se restó el fondo de las mediciones, dando como resultado un aumento aparente en la DO para la cepa Q1. Sin embargo, en estas condiciones, la cepa Q1 no mostró un crecimiento significativo. Por otra parte, cada una de las mutaciones de *thrA* dio como resultado un aumento similar y muy significativo en la tolerancia frente a la L-serina (figura 7), que les permite crecer a una concentración de L-serina de al menos 6,25 g/l, a diferencia de la cepa Q1 precursora. Ya que todos los mutantes de *thrA* tuvieron el mismo perfil de crecimiento, se seleccionó el mutante S357R como cepa precursora (citada como cepa Q1(DE3)-*thrAS357R*) para la ingeniería genómica multiplexada descrita más adelante.

Tabla S6: Cebadores usados para la integración genómica de mutaciones de *thrA* en el genoma.

Nombre del cebador	Secuencia
<i>thrA_gF</i>	ATGCGAGTGTTGAAGTTCGGCG
<i>thrA_gR</i>	TCAGACTCCTAACTTCCATGAGAGGG
<i>thrA_camsacB_F</i>	ATGCGAGTGTTGAAGTTCGGCGGTACATCAGTGGCAAATGCAGAACGTTTAAAT GAGACGTTGATCGGCACG
<i>thrA_camsacB_R</i>	TCAGACTCCTAACTTCCATGAGAGGGTACGTAGCAGATCAGCAAAGACACCAAAG GGAAAAGTGTCCATATGCAC

35 B. Ingeniería genómica multiplexada, detección sistemática y secuenciación de amplicones de mutaciones de ALE seleccionadas

Para identificar mutaciones que provocan tolerancia aumentada a la serina, se introdujeron mutaciones seleccionadas identificadas en el ejemplo 5 en la cepa Q1(DE3)-*thrAS357R* usando ingeniería genómica multiplexada (Wang *et al.*, 2011). El protocolo aplicado para la ingeniería genómica multiplexada fue similar al método publicado por Wang y Church, 2011. La cepa Q1(DE3)-*thrAS357R* se transformó con el plásmido pMA1 (que contenía únicamente la proteína beta bajo el control del promotor inducible por arabinosa). Los clones se emplacearon en placas de LB-ampicilina y se incubaron a 37 °C. Las colonias se cultivaron durante una noche en medio TY-amp-gly a 37 °C y se volvieron a inocular en 25 ml de medio TY-gly fresco al día siguiente. Después de alcanzar una D.O. de 0,4 a 37 °C, se añadió arabinosa a una concentración final del 0,2 %. Las células se volvieron a incubar a 37 °C y 250 rpm durante 15 min adicionales y después se hicieron electrocompetentes lavándolas dos veces con glicerol al 10 % (enfriado en hielo). El volumen final de células electrocompetentes se ajustó a 200 µl usando glicerol al 10 %. Los cebadores que se dirigen a los loci (*Irp* D143G, *eno* V164L, *argP* Q132K, *cycA* 1220V, *pykF* E250*, *rpoB*520L, *gcvA**, *yojL* D334H, *rho* R87L) se proporcionan en la tabla S7. Todos los cebadores se agruparon y ajustaron a una concentración final de 10 pmol/µl. A 50 µl de células, se le añadió 1 µl de esta mezcla y se transformaron mediante electroporación. Las células transformadas se añadieron directamente a 25 ml de medio TY-gly y se incubaron a 37 °C, 250 rpm durante dos horas hasta alcanzar una D.O. de 0,4, seguido de la inducción de arabinosa y la transformación como en el caso anterior para una segunda ronda de ingeniería multiplexada. El proceso se repitió seis veces. Después de la 6.ª ronda de ingeniería genómica multiplexada, las células se incubaron durante una noche. La biblioteca de mutantes resultantes se cultivó posteriormente en medio mínimo M9 con y sin serina. De esta forma, se enriquecieron las mutaciones que dieron como resultado velocidades de crecimiento aumentadas en medio mínimo o tolerancia aumentada a la serina:

Se añadieron un total de 1,5 µl de cultivo de una noche en triplicado a los pocillos en placas de microtitulación que contenían triplicados de 150 µl de medio M9 suplementado con glicina 2 mM y 2 g/l de glucosa (medio mínimo) o medio M9 con glicina 2 mM, 2 g/l de glucosa y 25 g/l de serina (medio mínimo con serina). Los perfiles de crecimiento se monitorizaron a 37 °C con agitación rápida continua en una placa de microtitulación durante 40 h. La densidad óptica se midió a 630 nm cada 5 min. Los triplicados se reunieron y usaron como molde para la generación de amplicones. El programa de la PCR y la composición de la reacción fue como se ha descrito en el ejemplo 1. Se siguió el protocolo de Illumina para el procesamiento de los amplicones y la secuenciación de última generación fue como se describe en el ejemplo 5. Los resultados de la secuenciación se analizaron computacionalmente y se calculó el enriquecimiento de las diversas mutaciones como la frecuencia de las mutaciones o bien en medio mínimo o en medio mínimo con serina, dividida entre la frecuencia de las mutaciones en la biblioteca no seleccionada (figura 8). Este experimento muestra que las mutaciones en *lrp*, *rho*, *argP* y *eno* dan como resultado una tolerancia aumentada a la serina.

Tabla S7: Cebadores usados para la ingeniería genómica multiplexada

Nombre del cebador	Secuencia
<i>lrpD143G</i>	GCTTGACTTCTTCCATAACAACGTAAGTGCGCGTCCCGTTAACCCAGGCAGACGC AGCAGGGTTTC
<i>enoV164L</i>	CCAACCGGCTGAATCATGAATTCTTGA ATGTCGAGATTATTATCAGCGTGCTCACCACCGTTGATGATG
<i>argPQ132K</i>	CTCAACTTGCAGGTAGAAGATGAAACGAGGAAAGAGAGGCTCCGCCGCGGCGA AGTGGTCGGC
<i>cycA1220V</i>	CAGCTCAATCCCCACGAAAGCTAATACGGCAACTTGAAAACCGGCAAAGAAGCCA CTTAAACCTTTC
<i>pykFE250***</i>	GCATCATGGTTGCGCGTGCGGAC CTCGGCGTTTAGTGACCCTAAATCTTCGCCCAGAAGATGATGA
<i>rpoBP520L</i>	GATACGACGTTTGTGCGTAATTTCTGAGAGGAGATTATTTTGGTCCATAAACTGA GACAGCTG
<i>gcvA***</i>	CTCGTAAGGCATTTAGCGGTGGTA ATGGTTATC ATTAGGCTATTAACCTTGGATGTTAAATG
<i>yojLD334H</i>	GGTGAGATTAATCGGACCAACGGAGAAGGCATTGTGTTGGTATGCAAACGTCAC GTTACGCAGCTCCAGC
<i>rhoR87L</i>	GAGATGGTATCACCAGTGCGGAGATTAATCTTAGTATCTGAGAAGGGGAAACG TAGATGTCATCAG

Tabla S8: Cebadores usados para la secuenciación de amplicones

Nombre del cebador	Secuencia
<i>lrp_F</i>	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGGTGATTTGACTACCTGTTG
<i>lrp_R</i>	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCGCGTCTTAATAACCAGACGAT
<i>enoV164_F</i>	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTGTACGAGCACATCGCTGAAC
<i>enoV164_R</i>	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCATGCGGATGGCTTCTTTCAC
<i>argP_F</i>	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG GACAGTCTGGCGACGTGGTTGCT
<i>argP_R</i>	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTATCGACAAGACAACCTCGGCAGCG
<i>cycA_F</i>	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGAAGCGTCATTGCGGCATTTG
<i>cycA_R</i>	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTTAATCGCGCGTGGCAGTG
<i>pyfK_F</i>	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCCTCAACAACCTTCGACGA
<i>pyfK_R</i>	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAATCCAGCATCTGGGTCGC

(continuación)

Nombre del cebador	Secuencia
rpoB_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAACGCCAAGCCGATTTCCG
rpoB_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTCTCGAACTTCAAGCCCTGC
gcvA_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTGGTAGAAGCTCAACGGAC
gcvA_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGCTGCGGCATCAAAAACCTCG
yojI_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCCTTTCAAAGCAGAGTTTCCGC
yojI_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTACCGTTGCCGCCAATCAG
rho_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCAGGATGGATTTGGTTTCTCC
rho_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCAGCGCAAATAGCGTTCACC

Ejemplo 7 - Producción de serina por *E. coli* tolerante y susceptible durante la fermentación discontinua

5 Se construyó un nuevo vector para regular positivamente la expresión del exportador junto con la vía de serina en el vector pACYC-Duet siguiendo la misma estrategia de antes mencionada en el ejemplo 2. Se clonó *serB* usando doble digestión con NcoI y HindIII seguida de ligamiento. Después, se sometió el vector resultante (pACYC-Duet-serB) a doble digestión con NdeI y PacI para la clonación de *ydeD*-c-His. Ambas cepas, Q1 (DE3) y Q3 (DE3) se hicieron electrocompetentes cultivando las células en 30 ml de medio 2xYT suplementado con glucosa al 0,2 % (37 °C, 250 rpm) hasta la fase logarítmica media. Las células se recogieron por centrifugación a 6500 rpm durante 5 min a 4 °C y se lavaron dos veces en glicerol al 10 % enfriado en hielo. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 µl de glicerol al 10 % y se transformaron 50 µl de células con los plásmidos pCDF-Duet1-*serAmut-serC* y pACYC-*serB-ydeD*-c-His para la producción de serina.

15 La producción de serina se demostró durante la fermentación discontinua alimentada en fermentadores de 1 l (Sartorius, Gottingen, Alemania). El medio contenía 2 g/l de MgSO₄*7H₂O, 2 g/l de KH₂PO₄, 5 g/l de (NH₄)₂SO₄, 7,5 g/l de glucosa, 2 g/l de extracto de levadura, 0,6 g/l de glicina, 0,12 g/l de treonina, oligoelementos 4X (como se menciona en el ejemplo 2), 50 mg/l de espectinomicina y 25 mg/l de cloranfenicol. Para la cepa *E. coli* Q1(DE3), la concentración inicial de glucosa fue de 10 g/l para potenciar el crecimiento antes de la inducción. La alimentación normalmente contenía 140 g/l de glucosa, 24 g/l de sulfato de amonio, 2 g/l de glicina, 0,12 g/l de treonina, 2,5 g/l de cada uno de MgSO₄*7H₂O y KH₂PO₄, oligoelementos 1X, 50 mg/l de espectinomicina y 25 mg/l de cloranfenicol, mientras que la alimentación para la cepa Q1(DE3) contenía 120 g/l de glucosa.

25 Se usó un cultivo en fase logarítmica para inocular 500 ml de medio mediante una relación de inoculación de 1:50. Se dejaron crecer los cultivos durante una noche en el fermentador a 37 °C, 1000 rpm de velocidad del deflector y saturación de aire al 20 %. La alimentación a la velocidad de 8 g/h se inició después de que la concentración de glucosa fuese inferior a 250 mg/l en el medio. La producción se indujo en la fase logarítmica tardía (D.O. 7,5 a 9,5) mediante la adición de IPTG 40 µM y la velocidad de alimentación se redujo a 6 g/h. Se tomaron muestras a intervalos regulares y se sometieron a análisis por HPLC y CLEM como se ha mencionado anteriormente.

30 El experimento demuestra que puede producirse serina con un título elevado y con un alto rendimiento en *E. coli* usando fermentación discontinua alimentada (figura 9). Los títulos fueron de 6,8 g/l y 12,5 g/l para la cepa Q1(DE3) y la cepa Q3(DE3), respectivamente. Las fermentaciones dieron como resultado un rendimiento de masa sorprendentemente elevado del 36,7 % a partir de glucosa en la cepa Q3(DE3) cuando se comparó con un 24,3 % en la cepa Q1(DE3) (figura 9B). Esto muestra que puede lograrse un título y un rendimiento mayores usando la cepa de producción que es tolerante a la serina.

Ejemplo 8 - Cepas modificadas por ingeniería genética inversa que muestran producción aumentada de serina

40 Se comprobó la tolerancia a la serina de las cepas modificadas por ingeniería genética inversa en el ejemplo 6 como se menciona en el ejemplo 3. Se comprobó la producción de serina de la cepa más tolerante a la serina (F7) y también se secuenció su genoma como se describe en el ejemplo 5. Se introdujeron plásmidos para la sobreexpresión de la vía de producción de serina como se describe en el ejemplo 7. Se llevaron a cabo experimentos en matraz de agitación como se describe en el ejemplo 2, siendo la única diferencia que la concentración de glucosa era de 2,5 g/l. Las mediciones de la D.O. y la toma de muestras se efectuaron a intervalos regulares y las muestras se analizaron usando los métodos descritos en el ejemplo 2. Sorprendentemente, dicha cepa dio como resultado una producción y rendimiento significativamente aumentados de serina a partir de glucosa, como se muestra en la tabla S9. La secuencia genómica reveló una eliminación de *zwf*, que codifica la primera enzima en la vía de pentosa fosfato. Además, la cepa portaba las mutaciones *thrAS357R* y *rhoR87L*. Además, la cepa también tenía un truncamiento del exportador de aminoácidos de cadena ramificada *brnQ* (se eliminaron 105 pb comenzando en la ubicación 419986. La proteína de 439 aminoácidos se truncó después de 308 aminoácidos).

Tabla S9: Efecto de Δzwf en la producción de serina

	Concentración de serina en g/l (+/- desviación típica)	Rendimiento a partir de glucosa (g de serina/g de glucosa)
$\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta tdcG \Delta glyA$ (Q1)	0,925 (+/- 0,048)	0,37
$\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta tdcG \Delta glyA \Delta zwf \Delta brnq thrA S357R rho R87L$	1,323 (+/- 0,06)	0,53

Ejemplo 9 - Producción mediante ALE 8

5

Para usar vectores pET como sistema de expresión, se integró un casete de DE3 que contenía polimerasa T7 en el genoma del mutante ALE 8-8 (ejemplo 5) usando un kit de lisogenización de DE3 Lambda (Millipore, Damstadt, Alemania) dando como resultado la cepa ALE 8-8(DE3). Posteriormente, ALE 8-8(DE3) se hizo electrocompetente cultivando las células en 30 ml de medio 2xYT suplementado con glucosa al 0,2 % (37 °C, 250 rpm) hasta la fase

10

logarítmica media. Las células se recogieron por centrifugación a 6500 rpm durante 5 min a 4 °C y se lavaron dos veces en glicerol al 10 % enfriado en hielo. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 μ l de glicerol al 10 % y se transformaron 50 μ l de células con los plásmidos pCDF-Duet1-*serAmut-serC* y pACYC-*serB* para la producción de serina.

15

La producción de serina se demostró durante la fermentación discontinua alimentada en fermentadores de 1 l (Sartorius, Göttingen, Alemania) como se menciona en el ejemplo 7. El medio contenía 2 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/l de KH_2PO_4 , 5 g/l de $(NH_4)_2SO_4$, 10 g/l de glucosa, 2 g/l de extracto de levadura, 0,6 g/l de glicina, oligoelementos 4X (como se menciona en el ejemplo 2), 50 mg/l de espectinomicina y 25 mg/l de cloranfenicol. Los 375 g de alimentación contenían 400 g/l de glucosa, 24 g/l de sulfato de amonio, 2 g/l de glicina, 2,5 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 5 g/l de KH_2PO_4 , oligoelementos 1X, 50 mg/l de espectinomicina y 25 mg/l de cloranfenicol. Se usó un cultivo en fase

20

logarítmica para inocular 500 ml de medio mediante una relación de inoculación de 1:50. Se dejaron crecer los cultivos durante una noche en el fermentador a 37 °C, 1000 rpm de velocidad del deflector y saturación de aire al 20 %. La producción se indujo en la fase logarítmica tardía (D.O. 8,5 a 9,5) mediante la adición de IPTG 80 μ M y se inició la alimentación a la velocidad de 8 g/h. Se tomaron muestras a intervalos regulares y se sometieron a análisis por HPLC y CLEM como se ha mencionado anteriormente.

25

El experimento demuestra que se pueden obtener tanto una alta densidad celular como un elevado título de serina (55,0 g/l) en la cepa ALE 8-8 (DE3) (figura 10A) con un rendimiento de masa a partir de glucosa del 36,0 % (figura 10B).

30

Ejemplo 10 - Sobreexpresión y mutagénesis por saturación de sitio de *thrA* en el sitio Y356, S357 y S359

Usando mutagénesis por saturación de sitio (SSM), pueden mutarse los restos de aminoácidos seleccionados a todos los otros 20 aminoácidos. Esto hace posible investigar el efecto de las sustituciones de aminoácidos en la actividad

35

enzimática y a su vez, en el fenotipo. El gen *thrA* se amplificó a partir de la cepa MG-1655 ts usando los cebadores *thrA_NcoI_F* y *thrA_HindIII* (secuencias de cebador en la tabla S10) y se clonaron en el plásmido pACYC-Duet1 usando las enzimas NcoI y HindIII. El protocolo de clonación fue el mismo que para la clonación de *serB* en el ejemplo 2. El vector construido fue pACYC-*thrA*. Este plásmido se usó como molde para la SSM. La SSM para las mutaciones *thrA* observadas en las cepas ALE (Y356, S357 y S359) se llevó a cabo usando los cebadores proporcionados en la tabla S10. El protocolo de SSM fue similar al protocolo de SDM aplicado en el ejemplo 2 para la mutagénesis de *serA* insensible a la retroalimentación. El producto de la PCR se digirió con DpnI y se transformó en la cepa Q1 (DE3), que porta el gen *thrA* de tipo silvestre en su genoma y se sembró en placas de LB-cloranfenicol suplementadas con glucosa al 0,1 % y glicina 4 mM. Se suplementó con cloranfenicol en todos los medios siguientes para la estabilidad del plásmido.

45

Se recogieron colonias individuales y se inocularon en placas MTP de 96 pocillos que contenían medio 2x TY suplementado con glucosa al 0,1 % y glicina 2 mM. Se recogieron 90 clones (1 placa de microtitulación (MTP)) de cada biblioteca de SSM (3 placas en total). Se inoculó la cepa Q1(DE3) que portaba el vector vacío pACYC-Duet y pACYC-*thrAwt* como cepa de control en cada placa. La placa se incubó a 37 °C y 300 rpm durante una noche. Esta placa de precultivo se usó como inóculo a partir del cual se añadió 1 μ l a una nueva placa MTP de 96 pocillos que contenía 100 μ l de medio M9 suplementado con glucosa al 0,2 %, glicina 2 mM. El cultivo se incubó durante 4 h, tras lo cual se añadieron 25 μ l de IPTG 1 mM para inducir la expresión. Posteriormente, la placa se incubó durante 2 h y después se añadió medio M9 que contenía glucosa al 0,2 %, glicina 2 mM y 12,5 g/l de L-serina, alcanzando de este modo una concentración final de serina de 6,25 g/l. Después, se incubó la placa con agitación en un lector de MTP

50

para analizar el crecimiento como se ha descrito anteriormente. Se recogieron clones seleccionados de cada placa que mostraban tolerancia en 1 placa y se repitieron para estas cepas los estudios de tolerancia. Los plásmidos para los clones tolerantes se secuenciaron y se estimaron las velocidades de crecimiento a partir de la fase logarítmica de cultivo. De esta forma, se identificó un número de sustituciones de aminoácidos que daban como resultado tolerancia a la serina (figura 11). La figura 11 (A-C) muestra la velocidad de crecimiento de cepas mutantes que tienen diferentes sustituciones de aminoácidos observadas en las posiciones 356, 357 y 359 de ThrA, respectivamente (indicadas por

60

el respectivo código de una letra). La velocidad de crecimiento de *E. coli* que porta el gen *thrA* de tipo silvestre se indica como "ts".

- 5 El experimento demuestra que las sustituciones de aminoácidos en la posición 356, 357 y/o 359 en la proteína ThrA nativa confieren tolerancia aumentada de las cepas modificadas a la L-serina. Los datos demuestran adicionalmente que la sobreexpresión de mutantes de ThrA puede aumentar la tolerancia a la L-serina incluso en cepas que tienen un gen *thrA* nativo presente en su genoma.

Tabla S10: Cebadores usados para la clonación y la mutagénesis por saturación de sitio (SSM) de *thrA*.

thrA_NcoI_F	GCGCCATGGGAGTGTTGAAGTTCGGCG
thrA_HindIII_R	GCCAAGCTTTCAGACTCCTAACTCCATGAGAGGG
thrA_Y356NNK_F	CGCAGAAACTGATGCTMNNTTCGGAAGATGATTGCG
thrA_Y356NNK_R	CGCAGAAACTGATGCTMNNTTCGGAAGATGATTGCG
thrA_S357NNK_F	CAATCATCTTCCGAATACNNKATCAGTTTCTGCGTTCC
thrA_S357NNK_R	GGAACGCAGAACTGATMNGTATTTCGGAAGATGATTG
thrA_S359NNK_F	CCGAATACAGCATCNNKTTCTGCGTTCCAC
thrA_S359NNK_R	GTGGAACGCAGAAMNNGATGCTGTATTCCGG

10

Lista de referencias citadas en la descripción

- 15 Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K: Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, 69:1-8.
- Hagishita T, Yoshida T, Izumi Y, Mitsunaga T: Efficient L-serine production from methanol and glycine by resting cells of *Methylobacterium* sp. strain MN43. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996, 60:1604-1607.
- 20 Burgard AP, Maranas CD: Probing the performance limits of the *Escherichia coli* metabolic network subject to gene additions or deletions. *Biotechnol Bioeng* 2001, 74:364-375.
- Li Y, Chen GK, Tong XW, Zhang HT, Liu XG, Liu YH, Lu FP: Construction of *Escherichia coli* strains producing L-serine from glucose. *Biotechnol Lett* 2012, 34:1525-1530.
- 25 Peters-Wendisch P, Stolz M, Etterich H, Kennerknecht N, Sahn H, Eggeling L: Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71:7139-7144.
- Gu P, Yang F, Su T, Li F, Li Y, Qi Q: Construction of an L-serine producing *Escherichia coli* via metabolic engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2014, 41:1443-1450.
- 30 Stolz M, Peters-Wendisch P, Etterich H, Gerharz T, Faurie R, Sahn H, Fersterra H, Eggeling L: Reduced folate supply as a key to enhanced L-serine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73:750-755.
- 35 Zhang X, Newman E: Deficiency in L-serine deaminase results in abnormal growth and cell division of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 2008, 69:870-881.
- Hama H, Sumita Y, Kakutani Y, Tsuda M, Tsuchiya T: Target of serine inhibition in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 168:1211-1216.
- 40 de Lorenzo V, Sekowska A, Danchin A: Chemical reactivity drives spatiotemporal organisation of bacterial metabolism. *FEMS Microbiol Rev* 2014.
- 45 Chowdhury A, Zomorodi AR, Maranas CD: k-OptForce: integrating kinetics with flux balance analysis for strain design. *PLoS Comput Biol* 2014, 10:e1003487.
- von Kamp A, Klamt S: Enumeration of smallest intervention strategies in genome-scale metabolic networks. *PLoS Comput Biol* 2014, 10:e1003378.
- 50 Qui Z y Goodman MF: The *Escherichia coli* *polB* locus is identical to *dinA*, the structural gene for DNA polymerase II. Characterization of Pol II purified from a *polB* mutant. *J Biol Chem*. 1997, 272(13): 8611-8617.
- Kwon DH, Peña JA, Osato MS, Fox JG, Graham DY, Versalovic J: Frameshift mutations in *rdxA* and metronidazole

- resistance in North American *Helicobacter pylori* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2000, 46(5): 793-796
- Yu D, Ellis HM, Lee E, Jenkins NA, Copeland NG y Court DL: An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97: 5978-5983.
- 5 Datsenko KA, Wanner BL: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:6640-6645.
- 10 Sawitzke JA, Thomason LC, Bubunenko M, Li X, Costantino N, Court DL: Recombineering: using drug cassettes to knock out genes *in vivo*. *Methods Enzymol* 2013, 533:79-102.
- Thomason LC, Costantino N, Court DL: *E. coli* genome manipulation by P1 transduction. *Curr Protoc Mol Biol* 2007, Capítulo 1:Unidad 1 17.
- 15 Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H: Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2006, 2:2006 0008.
- 20 Al-Rabee R, Zhang Y, Grant GA: The mechanism of velocity modulated allosteric regulation in D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. Site-directed mutagenesis of effector binding site residues. *J Biol Chem* 1996, 271:23235-23238.
- 25 Kildegaard KR, Hallstrom BM, Blicher TH, Sonnenschein N, Jensen NB, Sherstyk S, Harrison SJ, Maury J, Herrgard MJ, Juncker AS, *et al.*: Evolution reveals a glutathione-dependent mechanism of 3-hydroxypropionic acid tolerance. *Metab Eng* 2014, 26C:57-66.
- Deathrage DE, Barrick JE: Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol* 2014, 1151:165-188.
- 30 Langmead B, Salzberg SL: Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012, 9:357-359.
- Freddolino PL, Amini S, Tavazoie S: Newly identified genetic variations in common *Escherichia coli* MG1655 stock cultures. *J Bacteriol* 2012, 194:303-306.
- 35 Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM: Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* 2009, 460:894-898.
- 40 Wang HH, Church GM: Multiplexed genome engineering and genotyping methods applications for synthetic biology and metabolic engineering. *Methods Enzymol* 2011, 498:409-426.
- Mertens N, Remaut E, Fiers W. 1995. Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. *Biotechnology (N Y)* 13(2):175-9.
- 45 St-Pierre F, Cui L, Priest DG, Endy D, Dodd IB, Shearwin KE. 2013. One-step cloning and chromosomal integration of DNA. *ACS Synth Biol* 2(9):537-41.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Danmarks Tekniske Universitet
- <120> Método para la producción de L-serina usando bacterias modificados por ingeniería genética deficientes para las vías de degradación de la serina
- 55 <130> P81406303PCT00
- <150> EP15152643
- <151> 27/01/2015
- 60 <160> 103
- <170> PatentIn versión 3.5
- 65 <210> 1
- <211> 1365
- <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*

ES 2 807 448 T3

<400> 1

gtgattagtc tattcgacat gtttaagggtg gggattggtc cctcatcttc ccataaccgta 60
 gggcctatga aggcaggtaa acagttcgtc gatgatctgg tcgaaaaagg cttactggat 120
 agcgttactc gcggttgccgt ggacgtttat ggttcactgt cgctgacggg taaaggccac 180
 cacaccgata tcgccattat tatgggtctt gcaggtaacg aacctgccac cgtggatatac 240
 gacagtattc ccggttttat tcgcgacgta gaagagcgcg aacgtctgct gctggcacag 300
 ggacggcatg aagtggattt cccgcgcgac aacgggatgc gttttcataa cggcaacctg 360
 ccgctgcatg aaaacggtat gcaaatccac gcctataacg gcgatgaagt cgtctacagc 420
 aaaacttatt attccatcgg cggcgggttt atcgtcgatg aagaacactt tggtcaggat 480
 gctgccaacg aagtaagcgt gccgtatccg ttcaaactctg ccaccgaact gctcgcgtac 540
 tgtaatgaaa ccggctattc gctgtctggt ctcgctatgc agaacgaact ggcgctgcac 600
 agcaagaaag agatcgacga gtatctcgcg catgtctggc aaaccatgca ggcattgatac 660
 gatcgcggga tgaacaccga aggtgtactg ccaggcccgc tgcgcgtgcc acgtcgtgcg 720
 tctgccctgc gccggatgct ggtttccagc gataaactgt ctaacgatcc gatgaatgtc 780
 attgactggg taaacatggt tgcgctggca gttaacgaag aaaacgccgc cggtggtcgt 840
 gtggtaactg cgccaaccaa cggtgccctgc ggtatcgttc cggcagtgct ggcttactat 900
 gaccacttta ttgaatcggc cagcccggac atctataccc gttactttat ggcagcgggc 960
 gcgattgggtg cattgtataa aatgaacgcc tctatctccg gtgcggaagt tggttgccag 1020
 ggcgaagtgg gtggtgcctg ttcaatggct gctgcgggtc ttgcagaact gctgggcggt 1080
 agcccggaac aggtttgcgt ggcggcggaa attggcatgg aacacaacct tggtttaacc 1140
 tgcgaccggg ttgcagggca ggttcagggtg ccgtgcattg agcgtaatgc cattgcctct 1200
 gtgaaggcga ttaacgccgc gcggatggct ctgcgccgca ccagtgcacc gcgcgtctcg 1260
 ctggataagg tcatcgaaac gatgtacgaa accggtaagg acatgaacgc caaataccgc 1320
 gaaacctcac gcggtggtct ggcaatcaaa gtccagtggtg actaa 1365

<210> 2

<211> 1368

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 2

5

10

ES 2 807 448 T3

atgattagcg tattcgatat tttcaaaatc ggcattggcc cttccagttc tcataaccgtt 60
 ggaccaatga aagcgggtaa acaatttacc gacgatctga ttgcccgtaa cctgcttaaa 120
 gacgtgaccc gcgtggtggt tgacgtgtac ggctcgctct ctctgaccgg taaaggccac 180
 cacactgata tcgccattat tatgggcctg gcgggtaacc tgccggatac cgtggatatac 240
 gattccatcc ccagttttat tcaggatgtg aatactcatg gtcgcctgat gctggcaaac 300
 ggtcagcatg aagtggagtt cccggttgat cagtgcatac acttccacgc cgacaacctt 360
 tctctgcatg aaaacggtat gcgcattacc gcgctggcgg gcgataaagt cgtttacagc 420
 cagacttact actctattgg cgggtggcttt atcgttgatg aagagcattt tggccagcag 480
 gatagcgcac cggttgaagt tccttatccg tacagttcag cagccgatct gcaaaaacat 540
 tgtcaggaaa ccgggctgtc actctctggc ctgatgatga aaaacgagct ggcgctgcac 600
 agcaaagaag agctggaaca gcacctggcg aacgtctggg aagtcatgcg cggcggattt 660
 gagcgcggta tttccaccga aggcgtggtg cctggcaaac tgcgcggtcc acgccgtgct 720
 gcggcactac gccggatgct ggtcagccag gataaaaacca ccaactgaccc gatggcggtt 780
 gttgactgga tcaacatggt tgcactggca gtgaacgaag agaacgctgc tggcggctgc 840
 gtggtgactg cgccgactaa cgggtcgtgc gggattatcc cggcagttct ggcgtactac 900
 gacaagttta tccgcgaagt gaacgctaac tcaactggctc gttacctgct ggtagccagc 960
 gccattggtt ctctttataa gatgaacgcg tcgatttctg gtgctgaagt gggttgccag 1020
 ggtgaagttg gcgtggcgtg ctcaatggcg gcggctggtc tggcagaact attaggcgca 1080
 agcccggcgc aggtgtgcat cgcgggcgaa atcgccatgg agcacaacct cggctctgacg 1140
 tgtgacccgg tcgccggaca ggtacaggtg ccatgcatcg agcgtaacgc cattgcggca 1200
 gtaaaagcgg tgaacgccgc acgtatggcg ctgcgccgta ccagcgagcc gcgcgtctgc 1260
 ctcgataaag ttatcgaaac catgtacgaa acaggtaaag atatgaacgc caagtaccgc 1320
 gaaacctctc gcggcggcct ggcaatgaag atcgttgctt gcgattaa 1368

<210> 3
 <211> 1365
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 3

ES 2 807 448 T3

atgattagtg cattcgatat tttcaaaatt gggattggtc cctccagttc gcataccgtg 60
 gggccaatga atgccggaaa aagttttatt gatcggctgg aaagtagcgg cttattaacc 120
 gcgacgagcc atattgtggt cgatctgtac gggtcgttgt cactgacggg caaaggccat 180
 gccacggatg tcgccatcat catgggactg gcaggaaaca gtccgcagga tgttgtcatt 240
 gatgagatcc ctgcatttat agagttagta acgcgcagcg ggcggctgcc agtggcatct 300
 ggtgcgcata ttgttgattt tcctgtagca aagaacatta tcttccatcc cgaaatgttg 360
 cctcgccatg agaacggaat gcggatcact gcctggaagg gacaggaaga gctattaagt 420
 aaaacctatt actctgtcgg cggcggggtt attgtcgaag aagaacactt cggcctgtcg 480
 cacgatgtcg aaacgtccgt accttacgat ttccactcag caggtgaact gctgaaaatg 540
 tgtgattaca acggcctgtc tatatctggt ctgatgatgc acaacgagct agcgcctgcgc 600
 agcaaagcgg aaattgacgc cggttttgcc cgtatctggc aagtgatgca tgacggtatt 660
 gaacgtggga tgaacactga aggcgtgctg cctggtccgc tcaatgtgcc gcgccgtgcc 720
 gtagcgctgc gtcgtcagct ggtttccagc gataacatct ctaacgatcc gatgaatgtc 780
 atcgactgga tcaacatgta cgcgctggcg gttagtgaag aaaacgcagc tggcggggcgc 840
 gtggtaacgg caccgactaa cggtgcgctg ggcattattc cggcagtact ggcttattac 900
 gataagttcc gtcgtccggt aaacgagcgg tcaattgccc gctattttct ggccgcgggg 960
 gctattggcg cgctgtataa aatgaacgcc tccatctctg gcgcggaagt cggctgtcag 1020
 ggggagattg gcgtggcctg ttcaatggcg gcggcagggg taactgaact actgggcggc 1080
 agtccggcgc aggtatgcaa tgcggcggaa atcgcgatgg agcataacct tgggctgacc 1140
 tgcgatccgg ttgccggaca ggtacaaatc ccgtgcattg aacgtaatgc cattaatgcc 1200
 gtgaaagcag taaacgccgc gcggatggcg atgcgccgca cctcggcacc gcgtgtttca 1260
 ctcgataaag tgatcgagac gatgtatgaa accggcaaag atatgaacga taaataccgc 1320
 gaaacatcac gcggaggact ggccattaaa gtggtctgcg gctga 1365

<210> 4
 <211> 1254
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400> 4

atgttaaagc gtgaaatgaa cattgccgat tatgatgccg aactgtggca ggctatggag 60
 caggaaaaag tacgtcagga agagcacatc gaactgatcg cctccgaaaa ctacaccagc 120
 ccgcgcgtaa tgcaggcgca gggttctcag ctgaccaaca aatatgctga aggttatccg 180
 ggcaaacgct actacggcgg ttgcgagtat gttgatatcg ttgaacaact ggcgatcgat 240

5

10

ES 2 807 448 T3

cgtgcgaaag aactgttcgg cgctgactac gctaacgtcc agccgcactc cggctcccag 300
 gctaactttg cgggtctacac cgcgctgctg gaaccaggtg ataccgttct gggtatgaac 360
 ctggcgcgatg gcggtcacct gactcacggt tctccggtta acttctccgg taaactgtac 420
 aacatcgttc cttacggtat cgatgctacc ggtcatatcg actacgccga tctggaaaaa 480
 caagccaaag aacacaagcc gaaaatgatt atcggtggtt tctctgcata ttccggcgtg 540
 gtggactggg cgaaaatgcg tgaaatcgct gacagcatcg gtgcttacct gttcgttgat 600
 atggcgcacg ttgcgggcct ggttgctgct ggcgtctacc cgaacccggg tctcatgct 660
 cacgttgtta ctaccaccac tcacaaaacc ctggcgggtc cgcgcggcgg cctgatcctg 720
 gcgaaaggtg gtagcgaaga gctgtacaaa aaactgaact ctgccgtttt cctgggtggt 780
 cagggcggtc cgttgatgca cgtaatcgcc ggtaaagcgg ttgctctgaa agaagcgatg 840
 gagcctgagt tcaaaactta ccagcagcag gtcgctaaaa acgctaaagc gatggtagaa 900
 gtgttcctcg agcgcggcta caaagtgggt tccggcggca ctgataacca cctgttcctg 960
 gttgatctgg ttgataaaaa cctgaccggg aaagaagcag acgccgctct gggccgtgct 1020
 aacatcaccg tcaacaaaaa cagcgtaccg aacgatccga agagcccggt tgtgacctcc 1080
 ggtattcgtg taggtactcc ggcgattacc cgtcgcggct ttaaagaagc cgaagcgaaa 1140
 gaactggctg gctggatgtg tgacgtgctg gacagcatca atgatgaagc cgttatcgag 1200
 cgcataaaag gtaaagttct cgacatctgc gcacgttacc cggtttacgc ataa 1254

<210> 5
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 5

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

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

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

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

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

10

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

ES 2 807 448 T3

				85					90					95			
Arg	Gly	Ile	Pro	Val	Phe	Asn	Ala	Pro	Phe	Ser	Asn	Thr	Arg	Ser	Val		
			100					105					110				
Ala	Glu	Leu	Val	Ile	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Gly	Val	Pro		
		115					120					125					
Glu	Ala	Asn	Ala	Lys	Ala	His	Arg	Gly	Val	Trp	Asn	Lys	Leu	Ala	Ala		
	130					135					140						
Gly	Ser	Phe	Glu	Ala	Arg	Gly	Lys	Lys	Leu	Gly	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly		
145					150					155					160		
His	Ile	Gly	Thr	Gln	Leu	Gly	Ile	Leu	Ala	Glu	Ser	Leu	Gly	Met	Tyr		
				165					170					175			
Val	Tyr	Phe	Tyr	Asp	Ile	Glu	Asn	Lys	Leu	Pro	Leu	Gly	Asn	Ala	Thr		
			180					185					190				
Gln	Val	Gln	His	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Asn	Met	Ser	Asp	Val	Val	Ser		
		195					200					205					
Leu	His	Val	Pro	Glu	Asn	Pro	Ser	Thr	Lys	Asn	Met	Met	Gly	Ala	Lys		
	210					215					220						
Glu	Ile	Ser	Leu	Met	Lys	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Ile	Asn	Ala	Ser	Arg		
225					230					235					240		
Gly	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Pro	Ala	Leu	Cys	Asp	Ala	Leu	Ala	Ser	Lys		
				245					250					255			
His	Leu	Ala	Gly	Ala	Ala	Ile	Asp	Val	Phe	Pro	Thr	Glu	Pro	Ala	Thr		
			260					265					270				
Asn	Ser	Asp	Pro	Phe	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Glu	Phe	Asp	Asn	Val	Leu		
		275					280					285					
Leu	Thr	Pro	His	Ile	Gly	Gly	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	Gln	Glu	Asn	Ile		
	290					295					300						
Gly	Leu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ser	Asp	Asn	Gly	Ser		
305					310					315					320		
Thr	Leu	Ser	Ala	Val	Asn	Phe	Pro	Glu	Val	Ser	Leu	Pro	Leu	His	Gly		
				325					330					335			

ES 2 807 448 T3

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 410
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> SerA mutante

<400> 6

ES 2 807 448 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Val Trp Asn Lys Leu Ala Ala

ES 2 807 448 T3

130						135						140			
Gly	Ser	Phe	Glu	Ala	Arg	Gly	Lys	Lys	Leu	Gly	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly
145					150					155					160
His	Ile	Gly	Thr	Gln	Leu	Gly	Ile	Leu	Ala	Glu	Ser	Leu	Gly	Met	Tyr
				165					170					175	
Val	Tyr	Phe	Tyr	Asp	Ile	Glu	Asn	Lys	Leu	Pro	Leu	Gly	Asn	Ala	Thr
			180					185					190		
Gln	Val	Gln	His	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Asn	Met	Ser	Asp	Val	Val	Ser
		195					200					205			
Leu	His	Val	Pro	Glu	Asn	Pro	Ser	Thr	Lys	Asn	Met	Met	Gly	Ala	Lys
	210					215					220				
Glu	Ile	Ser	Leu	Met	Lys	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Ile	Asn	Ala	Ser	Arg
225					230					235					240
Gly	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Pro	Ala	Leu	Cys	Asp	Ala	Leu	Ala	Ser	Lys
				245					250					255	
His	Leu	Ala	Gly	Ala	Ala	Ile	Asp	Val	Phe	Pro	Thr	Glu	Pro	Ala	Thr
			260					265					270		
Asn	Ser	Asp	Pro	Phe	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Glu	Phe	Asp	Asn	Val	Leu
		275					280					285			
Leu	Thr	Pro	His	Ile	Gly	Gly	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	Gln	Glu	Asn	Ile
	290					295					300				
Gly	Leu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ser	Asp	Asn	Gly	Ser
305					310					315					320
Thr	Leu	Ser	Ala	Val	Asn	Phe	Pro	Glu	Val	Ser	Leu	Pro	Leu	His	Gly
				325					330					335	
Gly	Arg	Arg	Leu	Met	His	Ile	Ala	Glu	Ala	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Thr
			340					345					350		
Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	Phe	Ala	Glu	Gln	Gly	Val	Ala	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				

ES 2 807 448 T3

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

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

<210> 7
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 807 448 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys

<210> 8
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 8

5

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

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

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

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

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

10

ES 2 807 448 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 807 448 T3

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

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

<210> 9
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 9

Met Ser Arg Lys Asp Gly Val Leu Ala Leu Leu Val Val Val Trp
 1 5 10 15

Gly Leu Asn Phe Val Val Ile Lys Val Gly Leu His Asn Met Pro Pro
 20 25 30

Leu Met Leu Ala Gly Leu Arg Phe Met Leu Val Ala Phe Pro Ala Ile
 35 40 45

Phe Phe Val Ala Arg Pro Lys Val Pro Leu Asn Leu Leu Leu Gly Tyr
 50 55 60

Gly Leu Thr Ile Ser Phe Ala Gln Phe Ala Phe Leu Phe Cys Ala Ile
 65 70 75 80

Asn Phe Gly Met Pro Ala Gly Leu Ala Ser Leu Val Leu Gln Ala Gln
 85 90 95

Ala Phe Phe Thr Ile Met Leu Gly Ala Phe Thr Phe Gly Glu Arg Leu
 100 105 110

His Gly Lys Gln Leu Ala Gly Ile Ala Leu Ala Ile Phe Gly Val Leu
 115 120 125

Val Leu Ile Glu Asp Ser Leu Asn Gly Gln His Val Ala Met Leu Gly
 130 135 140

Phe Met Leu Thr Leu Ala Ala Ala Phe Ser Trp Ala Cys Gly Asn Ile
 145 150 155 160

Phe Asn Lys Lys Ile Met Ser His Ser Thr Arg Pro Ala Val Met Ser
 165 170 175

Leu Val Ile Trp Ser Ala Leu Ile Pro Ile Ile Pro Phe Phe Val Ala
 180 185 190

10

ES 2 807 448 T3

Ser Leu Ile Leu Asp Gly Ser Ala Thr Met Ile His Ser Leu Val Thr
 195 200 205

Ile Asp Met Thr Thr Ile Leu Ser Leu Met Tyr Leu Ala Phe Val Ala
 210 215 220

Thr Ile Val Gly Tyr Gly Ile Trp Gly Thr Leu Leu Gly Arg Tyr Glu
 225 230 235 240

Thr Trp Arg Val Ala Pro Leu Ser Leu Leu Val Pro Val Val Gly Leu
 245 250 255

Ala Ser Ala Ala Leu Leu Leu Asp Glu Arg Leu Thr Gly Leu Gln Phe
 260 265 270

Leu Gly Ala Val Leu Ile Met Thr Gly Leu Tyr Ile Asn Val Phe Gly
 275 280 285

Leu Arg Trp Arg Lys Ala Val Lys Val Gly Ser
 290 295

<210> 10

<211> 305

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> YdeD que contiene marcador de His en C-terminal

<400> 10

Met Ser Arg Lys Asp Gly Val Leu Ala Leu Leu Val Val Val Trp
 1 5 10 15

Gly Leu Asn Phe Val Val Ile Lys Val Gly Leu His Asn Met Pro Pro
 20 25 30

Leu Met Leu Ala Gly Leu Arg Phe Met Leu Val Ala Phe Pro Ala Ile
 35 40 45

Phe Phe Val Ala Arg Pro Lys Val Pro Leu Asn Leu Leu Leu Gly Tyr
 50 55 60

Gly Leu Thr Ile Ser Phe Ala Gln Phe Ala Phe Leu Phe Cys Ala Ile
 65 70 75 80

Asn Phe Gly Met Pro Ala Gly Leu Ala Ser Leu Val Leu Gln Ala Gln
 85 90 95

ES 2 807 448 T3

Ala Phe Phe Thr Ile Met Leu Gly Ala Phe Thr Phe Gly Glu Arg Leu
 100 105 110

His Gly Lys Gln Leu Ala Gly Ile Ala Leu Ala Ile Phe Gly Val Leu
 115 120 125

Val Leu Ile Glu Asp Ser Leu Asn Gly Gln His Val Ala Met Leu Gly
 130 135 140

Phe Met Leu Thr Leu Ala Ala Ala Phe Ser Trp Ala Cys Gly Asn Ile
 145 150 155 160

Phe Asn Lys Lys Ile Met Ser His Ser Thr Arg Pro Ala Val Met Ser
 165 170 175

Leu Val Ile Trp Ser Ala Leu Ile Pro Ile Ile Pro Phe Phe Val Ala
 180 185 190

Ser Leu Ile Leu Asp Gly Ser Ala Thr Met Ile His Ser Leu Val Thr
 195 200 205

Ile Asp Met Thr Thr Ile Leu Ser Leu Met Tyr Leu Ala Phe Val Ala
 210 215 220

Thr Ile Val Gly Tyr Gly Ile Trp Gly Thr Leu Leu Gly Arg Tyr Glu
 225 230 235 240

Thr Trp Arg Val Ala Pro Leu Ser Leu Leu Val Pro Val Val Gly Leu
 245 250 255

Ala Ser Ala Ala Leu Leu Leu Asp Glu Arg Leu Thr Gly Leu Gln Phe
 260 265 270

Leu Gly Ala Val Leu Ile Met Thr Gly Leu Tyr Ile Asn Val Phe Gly
 275 280 285

Leu Arg Trp Arg Lys Ala Val Lys Val Gly Ser His His His His His
 290 295 300

His
 305

<210> 11
 <211> 820
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 11

ES 2 807 448 T3

Met Arg Val Leu Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Ala Glu Arg
 1 5 10 15

Phe Leu Arg Val Ala Asp Ile Leu Glu Ser Asn Ala Arg Gln Gly Gln
 20 25 30

Val Ala Thr Val Leu Ser Ala Pro Ala Lys Ile Thr Asn His Leu Val
 35 40 45

Ala Met Ile Glu Lys Thr Ile Ser Gly Gln Asp Ala Leu Pro Asn Ile
 50 55 60

Ser Asp Ala Glu Arg Ile Phe Ala Glu Leu Leu Thr Gly Leu Ala Ala
 65 70 75 80

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

Glu Phe Ala Gln Ile Lys His Val Leu His Gly Ile Ser Leu Leu Gly
 100 105 110

Gln Cys Pro Asp Ser Ile Asn Ala Ala Leu Ile Cys Arg Gly Glu Lys
 115 120 125

Met Ser Ile Ala Ile Met Ala Gly Val Leu Glu Ala Arg Gly His Asn
 130 135 140

Val Thr Val Ile Asp Pro Val Glu Lys Leu Leu Ala Val Gly His Tyr
 145 150 155 160

Leu Glu Ser Thr Val Asp Ile Ala Glu Ser Thr Arg Arg Ile Ala Ala
 165 170 175

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

Gly Asn Glu Lys Gly Glu Leu Val Val Leu Gly Arg Asn Gly Ser Asp
 195 200 205

Tyr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ala Asp Cys Cys Glu
 210 215 220

Ile Trp Thr Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Cys Asp Pro Arg Gln Val
 225 230 235 240

Pro Asp Ala Arg Leu Leu Lys Ser Met Ser Tyr Gln Glu Ala Met Glu
 245 250 255

ES 2 807 448 T3

Leu Ser Tyr Phe Gly Ala Lys Val Leu His Pro Arg Thr Ile Thr Pro
 260 265 270

Ile Ala Gln Phe Gln Ile Pro Cys Leu Ile Lys Asn Thr Gly Asn Pro
 275 280 285

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

Pro Val Lys Gly Ile Ser Asn Leu Asn Asn Met Ala Met Phe Ser Val
 305 310 315 320

Ser Gly Pro Gly Met Lys Gly Met Val Gly Met Ala Ala Arg Val Phe
 325 330 335

Ala Ala Met Ser Arg Ala Arg Ile Ser Val Val Leu Ile Thr Gln Ser
 340 345 350

Ser Ser Glu Tyr Ser Ile Ser Phe Cys Val Pro Gln Ser Asp Cys Val
 355 360 365

Arg Ala Glu Arg Ala Met Gln Glu Glu Phe Tyr Leu Glu Leu Lys Glu
 370 375 380

Gly Leu Leu Glu Pro Leu Ala Val Thr Glu Arg Leu Ala Ile Ile Ser
 385 390 395 400

Val Val Gly Asp Gly Met Arg Thr Leu Arg Gly Ile Ser Ala Lys Phe
 405 410 415

Phe Ala Ala Leu Ala Arg Ala Asn Ile Asn Ile Val Ala Ile Ala Gln
 420 425 430

Gly Ser Ser Glu Arg Ser Ile Ser Val Val Val Asn Asn Asp Asp Ala
 435 440 445

Thr Thr Gly Val Arg Val Thr His Gln Met Leu Phe Asn Thr Asp Gln
 450 455 460

Val Ile Glu Val Phe Val Ile Gly Val Gly Gly Val Gly Gly Ala Leu
 465 470 475 480

Leu Glu Gln Leu Lys Arg Gln Gln Ser Trp Leu Lys Asn Lys His Ile
 485 490 495

Asp Leu Arg Val Cys Gly Val Ala Asn Ser Lys Ala Leu Leu Thr Asn
 500 505 510

ES 2 807 448 T3

Val His Gly Leu Asn Leu Glu Asn Trp Gln Glu Glu Leu Ala Gln Ala
515 520 525

Lys Glu Pro Phe Asn Leu Gly Arg Leu Ile Arg Leu Val Lys Glu Tyr
530 535 540

His Leu Leu Asn Pro Val Ile Val Asp Cys Thr Ser Ser Gln Ala Val
545 550 555 560

Ala Asp Gln Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Glu Gly Phe His Val Val Thr
565 570 575

Pro Asn Lys Lys Ala Asn Thr Ser Ser Met Asp Tyr Tyr His Gln Leu
580 585 590

Arg Tyr Ala Ala Glu Lys Ser Arg Arg Lys Phe Leu Tyr Asp Thr Asn
595 600 605

Val Gly Ala Gly Leu Pro Val Ile Glu Asn Leu Gln Asn Leu Leu Asn
610 615 620

Ala Gly Asp Glu Leu Met Lys Phe Ser Gly Ile Leu Ser Gly Ser Leu
625 630 635 640

Ser Tyr Ile Phe Gly Lys Leu Asp Glu Gly Met Ser Phe Ser Glu Ala
645 650 655

Thr Thr Leu Ala Arg Glu Met Gly Tyr Thr Glu Pro Asp Pro Arg Asp
660 665 670

Asp Leu Ser Gly Met Asp Val Ala Arg Lys Leu Leu Ile Leu Ala Arg
675 680 685

Glu Thr Gly Arg Glu Leu Glu Leu Ala Asp Ile Glu Ile Glu Pro Val
690 695 700

Leu Pro Ala Glu Phe Asn Ala Glu Gly Asp Val Ala Ala Phe Met Ala
705 710 715 720

Asn Leu Ser Gln Leu Asp Asp Leu Phe Ala Ala Arg Val Ala Lys Ala
725 730 735

Arg Asp Glu Gly Lys Val Leu Arg Tyr Val Gly Asn Ile Asp Glu Asp
740 745 750

Gly Val Cys Arg Val Lys Ile Ala Glu Val Asp Gly Asn Asp Pro Leu

ES 2 807 448 T3

755

760

765

Phe Lys Val Lys Asn Gly Glu Asn Ala Leu Ala Phe Tyr Ser His Tyr
770 775 780

Tyr Gln Pro Leu Pro Leu Val Leu Arg Gly Tyr Gly Ala Gly Asn Asp
785 790 795 800

Val Thr Ala Ala Gly Val Phe Ala Asp Leu Leu Arg Thr Leu Ser Trp
805 810 815

Lys Leu Gly Val
820

<210> 12

<211> 164

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 12

5

ES 2 807 448 T3

Met Val Asp Ser Lys Lys Arg Pro Gly Lys Asp Leu Asp Arg Ile Asp
 1 5 10 15

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

Glu Leu Ser Lys Arg Val Gly Leu Ser Pro Thr Pro Cys Leu Glu Arg
 35 40 45

Val Arg Arg Leu Glu Arg Gln Gly Phe Ile Gln Gly Tyr Thr Ala Leu
 50 55 60

Leu Asn Pro His Tyr Leu Asp Ala Ser Leu Leu Val Phe Val Glu Ile
 65 70 75 80

Thr Leu Asn Arg Gly Ala Pro Asp Val Phe Glu Gln Phe Asn Thr Ala
 85 90 95

Val Gln Lys Leu Glu Glu Ile Gln Glu Cys His Leu Val Ser Gly Asp
 100 105 110

Phe Asp Tyr Leu Leu Lys Thr Arg Val Pro Asp Met Ser Ala Tyr Arg
 115 120 125

Lys Leu Leu Gly Glu Thr Leu Leu Arg Leu Pro Gly Val Asn Asp Thr
 130 135 140

Arg Thr Tyr Val Val Met Glu Glu Val Lys Gln Ser Asn Arg Leu Val
 145 150 155 160

Ile Lys Thr Arg

5 <210> 13
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

10 <400> 13

ES 2 807 448 T3

Met Asn Leu Thr Glu Leu Lys Asn Thr Pro Val Ser Glu Leu Ile Thr
 1 5 10 15

Leu Gly Glu Asn Met Gly Leu Glu Asn Leu Ala Arg Met Arg Lys Gln
 20 25 30

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

Ile Phe Gly Asp Gly Val Leu Glu Ile Leu Gln Asp Gly Phe Gly Phe
 50 55 60

Leu Arg Ser Ala Asp Ser Ser Tyr Leu Ala Gly Pro Asp Asp Ile Tyr
 65 70 75 80

Val Ser Pro Ser Gln Ile Arg Arg Phe Asn Leu Arg Thr Gly Asp Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Lys Ile Arg Pro Pro Lys Glu Gly Glu Arg Tyr Phe Ala
 100 105 110

Leu Leu Lys Val Asn Glu Val Asn Phe Asp Lys Pro Glu Asn Ala Arg
 115 120 125

Asn Lys Ile Leu Phe Glu Asn Leu Thr Pro Leu His Ala Asn Ser Arg
 130 135 140

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

Val Leu Asp Leu Ala Ser Pro Ile Gly Arg Gly Gln Arg Gly Leu Ile
 165 170 175

Val Ala Pro Pro Lys Ala Gly Lys Thr Met Leu Leu Gln Asn Ile Ala
 180 185 190

Gln Ser Ile Ala Tyr Asn His Pro Asp Cys Val Leu Met Val Leu Leu

ES 2 807 448 T3

<400> 14

Met Ser Lys Ile Val Lys Ile Ile Gly Arg Glu Ile Ile Asp Ser Arg
1 5 10 15

Gly Asn Pro Thr Val Glu Ala Glu Val His Leu Glu Gly Gly Phe Val
20 25 30

Gly Met Ala Ala Ala Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ser Arg Glu Ala
35 40 45

Leu Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Ser Arg Phe Leu Gly Lys Gly Val
50 55 60

Thr Lys Ala Val Ala Ala Val Asn Gly Pro Ile Ala Gln Ala Leu Ile
65 70 75 80

Gly Lys Asp Ala Lys Asp Gln Ala Gly Ile Asp Lys Ile Met Ile Asp
85 90 95

Leu Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu
100 105 110

Ala Val Ser Leu Ala Asn Ala Lys Ala Ala Ala Ala Ala Lys Gly Met
115 120 125

Pro Leu Tyr Glu His Ile Ala Glu Leu Asn Gly Thr Pro Gly Lys Tyr
130 135 140

Ser Met Pro Val Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Glu His Ala
145 150 155 160

Asp Asn Asn Val Asp Ile Gln Glu Phe Met Ile Gln Pro Val Gly Ala
165 170 175

Lys Thr Val Lys Glu Ala Ile Arg Met Gly Ser Glu Val Phe His His
180 185 190

Leu Ala Lys Val Leu Lys Ala Lys Gly Met Asn Thr Ala Val Gly Asp
195 200 205

Glu Gly Gly Tyr Ala Pro Asn Leu Gly Ser Asn Ala Glu Ala Leu Ala
210 215 220

Val Ile Ala Glu Ala Val Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Gly Lys Asp
225 230 235 240

ES 2 807 448 T3

Ile Thr Leu Ala Met Asp Cys Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly
 245 250 255

Lys Tyr Val Leu Ala Gly Glu Gly Asn Lys Ala Phe Thr Ser Glu Glu
 260 265 270

Phe Thr His Phe Leu Glu Glu Leu Thr Lys Gln Tyr Pro Ile Val Ser
 275 280 285

Ile Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ser Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Gln
 290 295 300

Thr Lys Val Leu Gly Asp Lys Ile Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu Phe
 305 310 315 320

Val Thr Asn Thr Lys Ile Leu Lys Glu Gly Ile Glu Lys Gly Ile Ala
 325 330 335

Asn Ser Ile Leu Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr
 340 345 350

Leu Ala Ala Ile Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile
 355 360 365

Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala
 370 375 380

Val Gly Thr Ala Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser
 385 390 395 400

Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Glu Ala Leu
 405 410 415

Gly Glu Lys Ala Pro Tyr Asn Gly Arg Lys Glu Ile Lys Gly Gln Ala
 420 425 430

<210> 15
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 15

Met Lys Arg Pro Asp Tyr Arg Thr Leu Gln Ala Leu Asp Ala Val Ile
 1 5 10 15

Arg Glu Arg Gly Phe Glu Arg Ala Ala Gln Lys Leu Cys Ile Thr Gln
 20 25 30

10

ES 2 807 448 T3

Ser Ala Val Ser Gln Arg Ile Lys Gln Leu Glu Asn Met Phe Gly Gln
35 40 45

Pro Leu Leu Val Arg Thr Val Pro Pro Arg Pro Thr Glu Gln Gly Gln
50 55 60

Lys Leu Leu Ala Leu Leu Arg Gln Val Glu Leu Leu Glu Glu Glu Trp
65 70 75 80

Leu Gly Asp Glu Gln Thr Gly Ser Thr Pro Leu Leu Leu Ser Leu Ala
85 90 95

Val Asn Ala Asp Ser Leu Ala Thr Trp Leu Leu Pro Ala Leu Ala Pro
100 105 110

Val Leu Ala Asp Ser Pro Ile Arg Leu Asn Leu Gln Val Glu Asp Glu
115 120 125

Thr Arg Thr Gln Glu Arg Leu Arg Arg Gly Glu Val Val Gly Ala Val
130 135 140

Ser Ile Gln His Gln Ala Leu Pro Ser Cys Leu Val Asp Lys Leu Gly
145 150 155 160

Ala Leu Asp Tyr Leu Phe Val Ser Ser Lys Pro Phe Ala Glu Lys Tyr
165 170 175

Phe Pro Asn Gly Val Thr Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ala Pro Val Val
180 185 190

Ala Phe Asp His Leu Asp Asp Met His Gln Ala Phe Leu Gln Gln Asn
195 200 205

Phe Asp Leu Pro Pro Gly Ser Val Pro Cys His Ile Val Asn Ser Ser
210 215 220

Glu Ala Phe Val Gln Leu Ala Arg Gln Gly Thr Thr Cys Cys Met Ile
225 230 235 240

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

Leu Thr Pro Gly Leu Phe Gln Arg Arg Met Leu Tyr Trp His Arg Phe
260 265 270

Ala Pro Glu Ser Arg Met Met Arg Lys Val Thr Asp Ala Leu Leu Asp
275 280 285

ES 2 807 448 T3

Tyr Gly His Lys Val Leu Arg Gln Asp
 290 295

5 <210> 16
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 16

Met Ser Lys Glu Lys Phe Glu Arg Thr Lys Pro His Val Asn Val Gly
 1 5 10 15

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

Thr Thr Val Leu Ala Lys Thr Tyr Gly Gly Ala Ala Arg Ala Phe Asp
 35 40 45

Gln Ile Asp Asn Ala Pro Glu Glu Lys Ala Arg Gly Ile Thr Ile Asn
 50 55 60

Thr Ser His Val Glu Tyr Asp Thr Pro Thr Arg His Tyr Ala His Val
 65 70 75 80

Asp Cys Pro Gly His Ala Asp Tyr Val Lys Asn Met Ile Thr Gly Ala
 85 90 95

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

Met Pro Gln Thr Arg Glu His Ile Leu Leu Gly Arg Gln Val Gly Val
 115 120 125

Pro Tyr Ile Ile Val Phe Leu Asn Lys Cys Asp Met Val Asp Asp Glu
 130 135 140

Glu Leu Leu Glu Leu Val Glu Met Glu Val Arg Glu Leu Leu Ser Gln
 145 150 155 160

Tyr Asp Phe Pro Gly Asp Asp Thr Pro Ile Val Arg Gly Ser Ala Leu
 165 170 175

Lys Ala Leu Glu Gly Asp Ala Glu Trp Glu Ala Lys Ile Leu Glu Leu
 180 185 190

Ala Gly Phe Leu Asp Ser Tyr Ile Pro Glu Pro Glu Arg Ala Ile Asp
 195 200 205

10

ES 2 807 448 T3

Lys Pro Phe Leu Leu Pro Ile Glu Asp Val Phe Ser Ile Ser Gly Arg
 210 215 220

Gly Thr Val Val Thr Gly Arg Val Glu Arg Gly Ile Ile Lys Val Gly
 225 230 235 240

Glu Glu Val Glu Ile Val Gly Ile Lys Glu Thr Gln Lys Ser Thr Cys
 245 250 255

Thr Gly Val Glu Met Phe Arg Lys Leu Leu Asp Glu Gly Arg Ala Gly
 260 265 270

Glu Asn Val Gly Val Leu Leu Arg Gly Ile Lys Arg Glu Glu Ile Glu
 275 280 285

Arg Gly Gln Val Leu Ala Lys Pro Gly Thr Ile Lys Pro His Thr Lys
 290 295 300

Phe Glu Ser Glu Val Tyr Ile Leu Ser Lys Asp Glu Gly Gly Arg His
 305 310 315 320

Thr Pro Phe Phe Lys Gly Tyr Arg Pro Gln Phe Tyr Phe Arg Thr Thr
 325 330 335

Asp Val Thr Gly Thr Ile Glu Leu Pro Glu Gly Val Glu Met Val Met
 340 345 350

Pro Gly Asp Asn Ile Lys Met Val Val Thr Leu Ile His Pro Ile Ala
 355 360 365

Met Asp Asp Gly Leu Arg Phe Ala Ile Arg Glu Gly Gly Arg Thr Val
 370 375 380

Gly Ala Gly Val Val Ala Lys Val Leu Gly
 385 390

<210> 17
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 17

Met Val Asp Gln Val Lys Val Val Ala Asp Asp Gln Ala Pro Ala Glu
 1 5 10 15

Gln Ser Leu Arg Arg Asn Leu Thr Asn Arg His Ile Gln Leu Ile Ala
 20 25 30

10

ES 2 807 448 T3

Ile Gly Gly Ala Ile Gly Thr Gly Leu Phe Met Gly Ser Gly Lys Thr
35 40 45

Ile Ser Leu Ala Gly Pro Ser Ile Ile Phe Val Tyr Met Ile Ile Gly
50 55 60

Phe Met Leu Phe Phe Val Met Arg Ala Met Gly Glu Leu Leu Leu Ser
65 70 75 80

Asn Leu Glu Tyr Lys Ser Phe Ser Asp Phe Ala Ser Asp Leu Leu Gly
85 90 95

Pro Trp Ala Gly Tyr Phe Thr Gly Trp Thr Tyr Trp Phe Cys Trp Val
100 105 110

Val Thr Gly Met Ala Asp Val Val Ala Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Phe
115 120 125

Trp Phe Pro Asp Leu Ser Asp Trp Val Ala Ser Leu Ala Val Ile Val
130 135 140

Leu Leu Leu Thr Leu Asn Leu Ala Thr Val Lys Met Phe Gly Glu Met
145 150 155 160

Glu Phe Trp Phe Ala Met Ile Lys Ile Val Ala Ile Val Ser Leu Ile
165 170 175

Val Val Gly Leu Val Met Val Ala Met His Phe Gln Ser Pro Thr Gly
180 185 190

Val Glu Ala Ser Phe Ala His Leu Trp Asn Asp Gly Gly Trp Phe Pro
195 200 205

Lys Gly Leu Ser Gly Phe Phe Ala Gly Phe Gln Ile Ala Val Phe Ala
210 215 220

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

Pro Glu Lys Ser Leu Pro Arg Ala Ile Asn Ser Ile Pro Ile Arg Ile
245 250 255

Ile Met Phe Tyr Val Phe Ala Leu Ile Val Ile Met Ser Val Thr Pro
260 265 270

Trp Ser Ser Val Val Pro Glu Lys Ser Pro Phe Val Glu Leu Phe Val
275 280 285

ES 2 807 448 T3

Leu Val Gly Leu Pro Ala Ala Ala Ser Val Ile Asn Phe Val Val Leu
 290 295 300

Thr Ser Ala Ala Ser Ser Ala Asn Ser Gly Val Phe Ser Thr Ser Arg
 305 310 315 320

Met Leu Phe Gly Leu Ala Gln Glu Gly Val Ala Pro Lys Ala Phe Ala
 325 330 335

Lys Leu Ser Lys Arg Ala Val Pro Ala Lys Gly Leu Thr Phe Ser Cys
 340 345 350

Ile Cys Leu Leu Gly Gly Val Val Met Leu Tyr Val Asn Pro Ser Val
 355 360 365

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

Phe Val Trp Thr Ile Ile Leu Cys Ser Tyr Leu Val Tyr Arg Lys Gln
 385 390 395 400

Arg Pro His Leu His Glu Lys Ser Ile Tyr Lys Met Pro Leu Gly Lys
 405 410 415

Leu Met Cys Trp Val Cys Met Ala Phe Phe Val Phe Val Val Val Leu
 420 425 430

Leu Thr Leu Glu Asp Asp Thr Arg Gln Ala Leu Leu Val Thr Pro Leu
 435 440 445

Trp Phe Ile Ala Leu Gly Leu Gly Trp Leu Phe Ile Gly Lys Lys Arg
 450 455 460

Ala Ala Glu Leu Arg Lys
 465 470

<210> 18
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 18

Met Lys Gln Tyr Leu Ile Ala Pro Ser Ile Leu Ser Ala Asp Phe Ala
 1 5 10 15

Arg Leu Gly Glu Asp Thr Ala Lys Ala Leu Ala Ala Gly Ala Asp Val
 20 25 30

10

ES 2 807 448 T3

Val His Phe Asp Val Met Asp Asn His Tyr Val Pro Asn Leu Thr Ile
 35 40 45

Gly Pro Met Val Leu Lys Ser Leu Arg Asn Tyr Gly Ile Thr Ala Pro
 50 55 60

Ile Asp Val His Leu Met Val Lys Pro Val Asp Arg Ile Val Pro Asp
 65 70 75 80

Phe Ala Ala Ala Gly Ala Ser Ile Ile Thr Phe His Pro Glu Ala Ser
 85 90 95

Glu His Val Asp Arg Thr Leu Gln Leu Ile Lys Glu Asn Gly Cys Lys
 100 105 110

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

Val Met Asp Lys Leu Asp Val Ile Leu Leu Met Ser Val Asn Pro Gly
 130 135 140

Phe Gly Gly Gln Ser Phe Ile Pro Gln Thr Leu Asp Lys Leu Arg Glu
 145 150 155 160

Val Arg Arg Arg Ile Asp Glu Ser Gly Phe Asp Ile Arg Leu Glu Val
 165 170 175

Asp Gly Gly Val Lys Val Asn Asn Ile Gly Glu Ile Ala Ala Ala Gly
 180 185 190

Ala Asp Met Phe Val Ala Gly Ser Ala Ile Phe Asp Gln Pro Asp Tyr
 195 200 205

Lys Lys Val Ile Asp Glu Met Arg Ser Glu Leu Ala Lys Val Ser His
 210 215 220

Glu
 225

<210> 19
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 19

Met Glu Leu Leu Val Leu Val Trp Arg Gln Tyr Arg Trp Pro Phe Ile
 1 5 10 15

5

10

ES 2 807 448 T3

Ser Val Met Ala Leu Ser Leu Ala Ser Ala Ala Leu Gly Ile Gly Leu
 20 25 30

Ile Ala Phe Ile Asn Gln Arg Leu Ile Glu Thr Ala Asp Thr Ser Leu
 35 40 45

Leu Val Leu Pro Glu Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Met Ala Val
 50 55 60

Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ala Leu Thr Thr Leu Gly His His Phe Val
 65 70 75 80

Tyr Arg Leu Arg Ser Glu Phe Ile Lys Arg Ile Leu Asp Thr His Val
 85 90 95

Glu Arg Ile Glu Gln Leu Gly Ser Ala Ser Leu Leu Ala Gly Leu Thr
 100 105 110

Ser Asp Val Arg Asn Ile Thr Ile Ala Phe Val Arg Leu Pro Glu Leu
 115 120 125

Val Gln Gly Ile Ile Leu Thr Ile Gly Ser Ala Ala Tyr Leu Trp Met
 130 135 140

Leu Ser Gly Lys Met Leu Leu Val Thr Ala Ile Trp Met Ala Ile Thr
 145 150 155 160

Ile Trp Gly Gly Phe Val Leu Val Ala Arg Val Tyr Lys His Met Ala
 165 170 175

Thr Leu Arg Glu Thr Glu Asp Lys Leu Tyr Thr Asp Phe Gln Thr Val
 180 185 190

Leu Glu Gly Arg Lys Glu Leu Thr Leu Asn Arg Glu Arg Ala Glu Tyr
 195 200 205

Val Phe Asn Asn Leu Tyr Ile Pro Asp Ala Gln Glu Tyr Arg His His
 210 215 220

Ile Ile Arg Ala Asp Thr Phe His Leu Ser Ala Val Asn Trp Ser Asn
 225 230 235 240

Ile Met Met Leu Gly Ala Ile Gly Leu Val Phe Trp Met Ala Asn Ser
 245 250 255

Leu Gly Trp Ala Asp Thr Asn Val Ala Ala Thr Tyr Ser Leu Thr Leu

ES 2 807 448 T3

Phe Ile His Ala Asp Arg Leu Leu Glu Met Arg Asn Gly Gln Leu Ser
 515 520 525

Glu Leu Thr Gly Glu Glu Arg Asp Ala Ala Ser Arg Asp Ala Val Ala
 530 535 540

Arg Thr Ala
 545

<210> 20
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 20

Met Ser Glu Thr Phe Phe His Leu Leu Gly Pro Gly Thr Gln Pro Asn
 1 5 10 15

Asp Asp Ser Phe Ser Met Asn Pro Leu Pro Ile Thr Cys Gln Val Asn
 20 25 30

Asp Glu Pro Ser Met Ala Ala Leu Glu Gln Cys Ala His Ser Pro Gln
 35 40 45

Val Ile Ala Leu Leu Asn Glu Leu Gln His Gln Leu Ser Glu Arg Gln
 50 55 60

Pro Pro Leu Gly Glu Val Leu Ala Val Asp Leu Leu Asn Leu Asn Ala
 65 70 75 80

Asp Asp Arg His Phe Ile Asn Thr Leu Leu Gly Glu Gly Glu Val Ser
 85 90 95

Val Arg Ile Gln Gln Ala Asp Asp Ser Glu Ser Glu Ile Gln Glu Ala
 100 105 110

Ile Phe Cys Gly Leu Trp Arg Val Arg Arg Arg Arg Gly Glu Lys Leu
 115 120 125

Leu Glu Asp Lys Leu Glu Ala Gly Cys Ala Pro Leu Ala Leu Trp Gln
 130 135 140

Ala Ala Thr Gln Asn Leu Leu Pro Thr Asp Ser Leu Leu Pro Pro Pro
 145 150 155 160

Ile Asp Gly Leu Met Asn Gly Leu Pro Leu Ala His Glu Leu Leu Ala
 165 170 175

10

ES 2 807 448 T3

His Val Arg Asn Pro Asp Ala Gln Pro His Ser Ile Asn Leu Thr Gln
 180 185 190

Leu Pro Ile Ser Glu Ala Asp Arg Leu Phe Leu Ser Arg Leu Cys Gly
 195 200 205

Pro Gly Asn Ile Gln Ile Arg Thr Ile Gly Tyr Gly Glu Ser Tyr Ile
 210 215 220

Asn Ala Thr Gly Leu Arg His Val Trp His Leu Arg Cys Thr Asp Thr
 225 230 235 240

Leu Lys Gly Pro Leu Leu Glu Ser Tyr Glu Ile Cys Pro Ile Pro Glu
 245 250 255

Val Val Leu Ala Ala Pro Glu Asp Leu Val Asp Ser Ala Gln Arg Leu
 260 265 270

Ser Glu Val Cys Gln Trp Leu Ala Glu Ala Ala Pro Thr
 275 280 285

<210> 21
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 21

5

Met Lys Lys Thr Lys Ile Val Cys Thr Ile Gly Pro Lys Thr Glu Ser
 1 5 10 15

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

Leu Asn Phe Ser His Gly Asp Tyr Ala Glu His Gly Gln Arg Ile Gln
 35 40 45

Asn Leu Arg Asn Val Met Ser Lys Thr Gly Lys Thr Ala Ala Ile Leu
 50 55 60

Leu Asp Thr Lys Gly Pro Glu Ile Arg Thr Met Lys Leu Glu Gly Gly
 65 70 75 80

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

Lys Ser Val Ile Gly Asn Ser Glu Met Val Ala Val Thr Tyr Glu Gly
 100 105 110

10

ES 2 807 448 T3

Phe Thr Thr Asp Leu Ser Val Gly Asn Thr Val Leu Val Asp Asp Gly
 115 120 125

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

Lys Val Leu Asn Asn Gly Asp Leu Gly Glu Asn Lys Gly Val Asn Leu
 145 150 155 160

Pro Gly Val Ser Ile Ala Leu Pro Ala Leu Ala Glu Lys Asp Lys Gln
 165 170 175

Asp Leu Ile Phe Gly Cys Glu Gln Gly Val Asp Phe Val Ala Ala Ser
 180 185 190

Phe Ile Arg Lys Arg Ser Asp Val Ile Glu Ile Arg Glu His Leu Lys
 195 200 205

Ala His Gly Gly Glu Asn Ile His Ile Ile Ser Lys Ile Glu Asn Gln
 210 215 220

Glu Gly Leu Asn Asn Phe Asp Glu Ile Leu Glu Ala Ser Asp Gly Ile
 225 230 235 240

Met Val Ala Arg Gly Asp Leu Gly Val Glu Ile Pro Val Glu Glu Val
 245 250 255

Ile Phe Ala Gln Lys Met Met Ile Glu Lys Cys Ile Arg Ala Arg Lys
 260 265 270

Val Val Ile Thr Ala Thr Gln Met Leu Asp Ser Met Ile Lys Asn Pro
 275 280 285

Arg Pro Thr Arg Ala Glu Ala Gly Asp Val Ala Asn Ala Ile Leu Asp
 290 295 300

Gly Thr Asp Ala Val Met Leu Ser Gly Glu Ser Ala Lys Gly Lys Tyr
 305 310 315 320

Pro Leu Glu Ala Val Ser Ile Met Ala Thr Ile Cys Glu Arg Thr Asp
 325 330 335

Arg Val Met Asn Ser Arg Leu Glu Phe Asn Asn Asp Asn Arg Lys Leu
 340 345 350

Arg Ile Thr Glu Ala Val Cys Arg Gly Ala Val Glu Thr Ala Glu Lys
 355 360 365

ES 2 807 448 T3

Leu Asp Ala Pro Leu Ile Val Val Ala Thr Gln Gly Gly Lys Ser Ala
370 375 380

Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe Pro Asp Ala Thr Ile Leu Ala Leu Thr
385 390 395 400

Thr Asn Glu Lys Thr Ala His Gln Leu Val Leu Ser Lys Gly Val Val
405 410 415

Pro Gln Leu Val Lys Glu Ile Thr Ser Thr Asp Asp Phe Tyr Arg Leu
420 425 430

Gly Lys Glu Leu Ala Leu Gln Ser Gly Leu Ala His Lys Gly Asp Val
435 440 445

Val Val Met Val Ser Gly Ala Leu Val Pro Ser Gly Thr Thr Asn Thr
450 455 460

Ala Ser Val His Val Leu
465 470

<210> 22
<211> 249
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

5

<400> 22

Met Lys Lys Thr Lys Ile Val Cys Thr Ile Gly Pro Lys Thr Glu Ser
1 5 10 15

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

Leu Asn Phe Ser His Gly Asp Tyr Ala Glu His Gly Gln Arg Ile Gln
35 40 45

Asn Leu Arg Asn Val Met Ser Lys Thr Gly Lys Thr Ala Ala Ile Leu
50 55 60

Leu Asp Thr Lys Gly Pro Glu Ile Arg Thr Met Lys Leu Glu Gly Gly
65 70 75 80

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

Lys Ser Val Ile Gly Asn Ser Glu Met Val Ala Val Thr Tyr Glu Gly
100 105 110

10

ES 2 807 448 T3

Phe Thr Thr Asp Leu Ser Val Gly Asn Thr Val Leu Val Asp Asp Gly
 115 120 125

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

Lys Val Leu Asn Asn Gly Asp Leu Gly Glu Asn Lys Gly Val Asn Leu
 145 150 155 160

Pro Gly Val Ser Ile Ala Leu Pro Ala Leu Ala Glu Lys Asp Lys Gln
 165 170 175

Asp Leu Ile Phe Gly Cys Glu Gln Gly Val Asp Phe Val Ala Ala Ser
 180 185 190

Phe Ile Arg Lys Arg Ser Asp Val Ile Glu Ile Arg Glu His Leu Lys
 195 200 205

Ala His Gly Gly Glu Asn Ile His Ile Ile Ser Lys Ile Glu Asn Gln
 210 215 220

Glu Gly Leu Asn Asn Phe Asp Glu Ile Leu Glu Ala Ser Asp Gly Ile
 225 230 235 240

Met Val Ala Arg Gly Asp Leu Gly Val
 245

<210> 23
 <211> 901
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 23

Met Leu Ile Pro Ser Lys Leu Ser Arg Pro Val Arg Leu Asp His Thr
 1 5 10 15

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

Arg Leu Ala Leu Ile Thr Ser Pro Ala Gly Tyr Gly Lys Thr Thr Leu
 35 40 45

Ile Ser Gln Trp Ala Ala Gly Lys Asn Asp Ile Gly Trp Tyr Ser Leu
 50 55 60

Asp Glu Gly Asp Asn Gln Gln Glu Arg Phe Ala Ser Tyr Leu Ile Ala
 65 70 75 80

10

ES 2 807 448 T3

Ala Val Gln Gln Ala Thr Asn Gly His Cys Ala Ile Cys Glu Thr Met
85 90 95

Ala Gln Lys Arg Gln Tyr Ala Ser Leu Thr Ser Leu Phe Ala Gln Leu
100 105 110

Phe Ile Glu Leu Ala Glu Trp His Ser Pro Leu Tyr Leu Val Ile Asp
115 120 125

Asp Tyr His Leu Ile Thr Asn Pro Val Ile His Glu Ser Met Arg Phe
130 135 140

Phe Ile Arg His Gln Pro Glu Asn Leu Thr Leu Val Val Leu Ser Arg
145 150 155 160

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

Leu Glu Ile Gly Ser Gln Gln Leu Ala Phe Thr His Gln Glu Ala Lys
180 185 190

Gln Phe Phe Asp Cys Arg Leu Ser Ser Pro Ile Glu Ala Ala Glu Ser
195 200 205

Ser Arg Ile Cys Asp Asp Val Ser Gly Trp Ala Thr Ala Leu Gln Leu
210 215 220

Ile Ala Leu Ser Ala Arg Gln Asn Thr His Ser Ala His Lys Ser Ala
225 230 235 240

Arg Arg Leu Ala Gly Ile Asn Ala Ser His Leu Ser Asp Tyr Leu Val
245 250 255

Asp Glu Val Leu Asp Asn Val Asp Leu Ala Thr Arg His Phe Leu Leu
260 265 270

Lys Ser Ala Ile Leu Arg Ser Met Asn Asp Ala Leu Ile Thr Arg Val
275 280 285

Thr Gly Glu Glu Asn Gly Gln Met Arg Leu Glu Glu Ile Glu Arg Gln
290 295 300

Gly Leu Phe Leu Gln Arg Met Asp Asp Thr Gly Glu Trp Phe Cys Tyr
305 310 315 320

His Pro Leu Phe Gly Asn Phe Leu Arg Gln Arg Cys Gln Trp Glu Leu
325 330 335

ES 2 807 448 T3

Ala Ala Glu Leu Pro Glu Ile His Arg Ala Ala Ala Glu Ser Trp Met
 340 345 350

Ala Gln Gly Phe Pro Ser Glu Ala Ile His His Ala Leu Ala Ala Gly
 355 360 365

Asp Ala Leu Met Leu Arg Asp Ile Leu Leu Asn His Ala Trp Ser Leu
 370 375 380

Phe Asn His Ser Glu Leu Ser Leu Leu Glu Glu Ser Leu Lys Ala Leu
 385 390 395 400

Pro Trp Asp Ser Leu Leu Glu Asn Pro Gln Leu Val Leu Leu Gln Ala
 405 410 415

Trp Leu Met Gln Ser Gln His Arg Tyr Gly Glu Val Asn Thr Leu Leu
 420 425 430

Ala Arg Ala Glu His Glu Ile Lys Asp Ile Arg Glu Asp Thr Met His
 435 440 445

Ala Glu Phe Asn Ala Leu Arg Ala Gln Val Ala Ile Asn Asp Gly Asn
 450 455 460

Pro Asp Glu Ala Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ala Leu Glu Glu Leu Pro
 465 470 475 480

Pro Gly Trp Phe Tyr Ser Arg Ile Val Ala Thr Ser Val Leu Gly Glu
 485 490 495

Val Leu His Cys Lys Gly Glu Leu Thr Arg Ser Leu Ala Leu Met Gln
 500 505 510

Gln Thr Glu Gln Met Ala Arg Gln His Asp Val Trp His Tyr Ala Leu
 515 520 525

Trp Ser Leu Ile Gln Gln Ser Glu Ile Leu Phe Ala Gln Gly Phe Leu
 530 535 540

Gln Thr Ala Trp Glu Thr Gln Glu Lys Ala Phe Gln Leu Ile Asn Glu
 545 550 555 560

Gln His Leu Glu Gln Leu Pro Met His Glu Phe Leu Val Arg Ile Arg
 565 570 575

Ala Gln Leu Leu Trp Ala Trp Ala Arg Leu Asp Glu Ala Glu Ala Ser

ES 2 807 448 T3

			580					585						590			
Ala	Arg	Ser	Gly	Ile	Glu	Val	Leu	Ser	Ser	Tyr	Gln	Pro	Gln	Gln	Gln		
		595					600					605					
Leu	Gln	Cys	Leu	Ala	Met	Leu	Ile	Gln	Cys	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Asp		
	610					615					620						
Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Ser	Gln	Leu	Asn	Arg	Leu	Glu	Asn	Leu	Leu	Gly		
	625				630					635					640		
Asn	Gly	Lys	Tyr	His	Ser	Asp	Trp	Ile	Ser	Asn	Ala	Asn	Lys	Val	Arg		
				645					650					655			
Val	Ile	Tyr	Trp	Gln	Met	Thr	Gly	Asp	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Trp		
			660					665						670			
Leu	Arg	His	Thr	Ala	Lys	Pro	Glu	Phe	Ala	Asn	Asn	His	Phe	Leu	Gln		
		675					680					685					
Gly	Gln	Trp	Arg	Asn	Ile	Ala	Arg	Ala	Gln	Ile	Leu	Leu	Gly	Glu	Phe		
	690					695					700						
Glu	Pro	Ala	Glu	Ile	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Glu	Asn	Ala	Arg	Ser		
	705				710					715					720		
Leu	Arg	Leu	Met	Ser	Asp	Leu	Asn	Arg	Asn	Leu	Leu	Leu	Leu	Asn	Gln		
				725					730					735			
Leu	Tyr	Trp	Gln	Ala	Gly	Arg	Lys	Ser	Asp	Ala	Gln	Arg	Val	Leu	Leu		
			740					745					750				
Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Ala	Asn	Arg	Thr	Gly	Phe	Ile	Ser	His	Phe	Val		
		755					760					765					
Ile	Glu	Gly	Glu	Ala	Met	Ala	Gln	Gln	Leu	Arg	Gln	Leu	Ile	Gln	Leu		
	770					775					780						
Asn	Thr	Leu	Pro	Glu	Leu	Glu	Gln	His	Arg	Ala	Gln	Arg	Ile	Leu	Arg		
	785				790					795					800		
Glu	Ile	Asn	Gln	His	His	Arg	His	Lys	Phe	Ala	His	Phe	Asp	Glu	Asn		
				805					810					815			
Phe	Val	Glu	Arg	Leu	Leu	Asn	His	Pro	Glu	Val	Pro	Glu	Leu	Ile	Arg		
			820					825					830				

ES 2 807 448 T3

Thr Ser Pro Leu Thr Gln Arg Glu Trp Gln Val Leu Gly Leu Ile Tyr
835 840 845

Ser Gly Tyr Ser Asn Glu Gln Ile Ala Gly Glu Leu Glu Val Ala Ala
850 855 860

Thr Thr Ile Lys Thr His Ile Arg Asn Leu Tyr Gln Lys Leu Gly Val
865 870 875 880

Ala His Arg Gln Asp Ala Val Gln His Ala Gln Gln Leu Leu Lys Met
885 890 895

Met Gly Tyr Gly Val
900

<210> 24
<211> 779
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

5

<400> 24

Met Leu Ile Pro Ser Lys Leu Ser Arg Pro Val Arg Leu Asp His Thr
1 5 10 15

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

Arg Leu Ala Leu Ile Thr Ser Pro Ala Gly Tyr Gly Lys Thr Thr Leu
35 40 45

Ile Ser Gln Trp Ala Ala Gly Lys Asn Asp Ile Gly Trp Tyr Ser Leu
50 55 60

Asp Glu Gly Asp Asn Gln Gln Glu Arg Phe Ala Ser Tyr Leu Ile Ala
65 70 75 80

Ala Val Gln Gln Ala Thr Asn Gly His Cys Ala Ile Cys Glu Thr Met
85 90 95

Ala Gln Lys Arg Gln Tyr Ala Ser Leu Thr Ser Leu Phe Ala Gln Leu
100 105 110

Phe Ile Glu Leu Ala Glu Trp His Ser Pro Leu Tyr Leu Val Ile Asp
115 120 125

Asp Tyr His Leu Ile Thr Asn Pro Val Ile His Glu Ser Met Arg Phe
130 135 140

10

ES 2 807 448 T3

Phe Ile Arg His Gln Pro Glu Asn Leu Thr Leu Val Val Leu Ser Arg
 145 150 155 160
 Asn Leu Pro Gln Leu Gly Ile Ala Asn Leu Arg Val Arg Asp Gln Leu
 165 170 175
 Leu Glu Ile Gly Ser Gln Gln Leu Ala Phe Thr His Gln Glu Ala Lys
 180 185 190
 Gln Phe Phe Asp Cys Arg Leu Ser Ser Pro Ile Glu Ala Ala Glu Ser
 195 200 205
 Ser Arg Ile Cys Asp Asp Val Ser Gly Trp Ala Thr Ala Leu Gln Leu
 210 215 220
 Ile Ala Leu Ser Ala Arg Gln Asn Thr His Ser Ala His Lys Ser Ala
 225 230 235 240
 Arg Arg Leu Ala Gly Ile Asn Ala Ser His Leu Ser Asp Tyr Leu Val
 245 250 255
 Asp Glu Val Leu Asp Asn Val Asp Leu Ala Thr Arg His Phe Leu Leu
 260 265 270
 Lys Ser Ala Ile Leu Arg Ser Met Asn Asp Ala Leu Ile Thr Arg Val
 275 280 285
 Thr Gly Glu Glu Asn Gly Gln Met Arg Leu Glu Glu Ile Glu Arg Gln
 290 295 300
 Gly Leu Phe Leu Gln Arg Met Asp Asp Thr Gly Glu Trp Phe Cys Tyr
 305 310 315 320
 His Pro Leu Phe Gly Asn Phe Leu Arg Gln Arg Cys Gln Trp Glu Leu
 325 330 335
 Ala Ala Glu Leu Pro Glu Ile His Arg Ala Ala Ala Glu Ser Trp Met
 340 345 350
 Ala Gln Gly Phe Pro Ser Glu Ala Ile His His Ala Leu Ala Ala Gly
 355 360 365
 Asp Ala Leu Met Leu Arg Asp Ile Leu Leu Asn His Ala Trp Ser Leu
 370 375 380
 Phe Asn His Ser Glu Leu Ser Leu Leu Glu Glu Ser Leu Lys Ala Leu
 385 390 395 400

ES 2 807 448 T3

Pro Trp Asp Ser Leu Leu Glu Asn Pro Gln Leu Val Leu Leu Gln Ala
 405 410 415

Trp Leu Met Gln Ser Gln His Arg Tyr Gly Glu Val Asn Thr Leu Leu
 420 425 430

Ala Arg Ala Glu His Glu Ile Lys Asp Ile Arg Glu Asp Thr Met His
 435 440 445

Ala Glu Phe Asn Ala Leu Arg Ala Gln Val Ala Ile Asn Asp Gly Asn
 450 455 460

Pro Asp Glu Ala Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ala Leu Glu Glu Leu Pro
 465 470 475 480

Pro Gly Trp Phe Tyr Ser Arg Ile Val Ala Thr Ser Val Leu Gly Glu
 485 490 495

Val Leu His Cys Lys Gly Glu Leu Thr Arg Ser Leu Ala Leu Met Gln
 500 505 510

Gln Thr Glu Gln Met Ala Arg Gln His Asp Val Trp His Tyr Ala Leu
 515 520 525

Trp Ser Leu Ile Gln Gln Ser Glu Ile Leu Phe Ala Gln Gly Phe Leu
 530 535 540

Gln Thr Ala Trp Glu Thr Gln Glu Lys Ala Phe Gln Leu Ile Asn Glu
 545 550 555 560

Gln His Leu Glu Gln Leu Pro Met His Glu Phe Leu Val Arg Ile Arg
 565 570 575

Ala Gln Leu Leu Trp Ala Trp Ala Arg Leu Asp Glu Ala Glu Ala Ser
 580 585 590

Ala Arg Ser Gly Ile Glu Val Leu Ser Ser Tyr Gln Pro Gln Gln Gln
 595 600 605

Leu Gln Cys Leu Ala Met Leu Ile Gln Cys Ser Leu Ala Arg Gly Asp
 610 615 620

Leu Asp Asn Ala Arg Ser Gln Leu Asn Arg Leu Glu Asn Leu Leu Gly
 625 630 635 640

Asn Gly Lys Tyr His Ser Asp Trp Ile Ser Asn Ala Asn Lys Val Arg
 645 650 655

ES 2 807 448 T3

Val Ile Tyr Trp Gln Met Thr Gly Asp Lys Ala Ala Ala Ala Asn Trp
 660 665 670

Leu Arg His Thr Ala Lys Pro Glu Phe Ala Asn Asn His Phe Leu Gln
 675 680 685

Gly Gln Trp Arg Asn Ile Ala Arg Ala Gln Ile Leu Leu Gly Glu Phe
 690 695 700

Glu Pro Ala Glu Ile Val Leu Glu Glu Leu Asn Glu Asn Ala Arg Ser
 705 710 715 720

Leu Arg Leu Met Ser Asp Leu Asn Arg Asn Leu Leu Leu Leu Asn Gln
 725 730 735

Leu Tyr Trp Gln Ala Gly Arg Lys Ser Asp Ala Gln Arg Val Leu Leu
 740 745 750

Asp Ala Leu Lys Leu Ala Asn Arg Thr Gly Phe Ile Ser His Phe Val
 755 760 765

Ile Glu Gly Glu Ala Met Ala Gln Gln Leu Arg
 770 775

<210> 25
 <211> 1342
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 25

Met Val Tyr Ser Tyr Thr Glu Lys Lys Arg Ile Arg Lys Asp Phe Gly
 1 5 10 15

Lys Arg Pro Gln Val Leu Asp Val Pro Tyr Leu Leu Ser Ile Gln Leu
 20 25 30

Asp Ser Phe Gln Lys Phe Ile Glu Gln Asp Pro Glu Gly Gln Tyr Gly
 35 40 45

Leu Glu Ala Ala Phe Arg Ser Val Phe Pro Ile Gln Ser Tyr Ser Gly
 50 55 60

Asn Ser Glu Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Arg Leu Gly Glu Pro Val Phe
 65 70 75 80

Asp Val Gln Glu Cys Gln Ile Arg Gly Val Thr Tyr Ser Ala Pro Leu
 85 90 95

10

ES 2 807 448 T3

Arg Val Lys Leu Arg Leu Val Ile Tyr Glu Arg Glu Ala Pro Glu Gly
 100 105 110

Thr Val Lys Asp Ile Lys Glu Gln Glu Val Tyr Met Gly Glu Ile Pro
 115 120 125

Leu Met Thr Asp Asn Gly Thr Phe Val Ile Asn Gly Thr Glu Arg Val
 130 135 140

Ile Val Ser Gln Leu His Arg Ser Pro Gly Val Phe Phe Asp Ser Asp
 145 150 155 160

Lys Gly Lys Thr His Ser Ser Gly Lys Val Leu Tyr Asn Ala Arg Ile
 165 170 175

Ile Pro Tyr Arg Gly Ser Trp Leu Asp Phe Glu Phe Asp Pro Lys Asp
 180 185 190

Asn Leu Phe Val Arg Ile Asp Arg Arg Arg Lys Leu Pro Ala Thr Ile
 195 200 205

Ile Leu Arg Ala Leu Asn Tyr Thr Thr Glu Gln Ile Leu Asp Leu Phe
 210 215 220

Phe Glu Lys Val Ile Phe Glu Ile Arg Asp Asn Lys Leu Gln Met Glu
 225 230 235 240

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

Ala Asn Gly Lys Val Tyr Val Glu Lys Gly Arg Arg Ile Thr Ala Arg
 260 265 270

His Ile Arg Gln Leu Glu Lys Asp Asp Val Lys Leu Ile Glu Val Pro
 275 280 285

Val Glu Tyr Ile Ala Gly Lys Val Val Ala Lys Asp Tyr Ile Asp Glu
 290 295 300

Ser Thr Gly Glu Leu Ile Cys Ala Ala Asn Met Glu Leu Ser Leu Asp
 305 310 315 320

Leu Leu Ala Lys Leu Ser Gln Ser Gly His Lys Arg Ile Glu Thr Leu
 325 330 335

Phe Thr Asn Asp Leu Asp His Gly Pro Tyr Ile Ser Glu Thr Leu Arg

ES 2 807 448 T3

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

ES 2 807 448 T3

Lys Val Thr Asp Gly Val Val Thr Asp Glu Ile His Tyr Leu Ser Ala
 595 600 605
 Ile Glu Glu Gly Asn Tyr Val Ile Ala Gln Ala Asn Ser Asn Leu Asp
 610 615 620
 Glu Glu Gly His Phe Val Glu Asp Leu Val Thr Cys Arg Ser Lys Gly
 625 630 635 640
 Glu Ser Ser Leu Phe Ser Arg Asp Gln Val Asp Tyr Met Asp Val Ser
 645 650 655
 Thr Gln Gln Val Val Ser Val Gly Ala Ser Leu Ile Pro Phe Leu Glu
 660 665 670
 His Asp Asp Ala Asn Arg Ala Leu Met Gly Ala Asn Met Gln Arg Gln
 675 680 685
 Ala Val Pro Thr Leu Arg Ala Asp Lys Pro Leu Val Gly Thr Gly Met
 690 695 700
 Glu Arg Ala Val Ala Val Asp Ser Gly Val Thr Ala Val Ala Lys Arg
 705 710 715 720
 Gly Gly Val Val Gln Tyr Val Asp Ala Ser Arg Ile Val Ile Lys Val
 725 730 735
 Asn Glu Asp Glu Met Tyr Pro Gly Glu Ala Gly Ile Asp Ile Tyr Asn
 740 745 750
 Leu Thr Lys Tyr Thr Arg Ser Asn Gln Asn Thr Cys Ile Asn Gln Met
 755 760 765
 Pro Cys Val Ser Leu Gly Glu Pro Val Glu Arg Gly Asp Val Leu Ala
 770 775 780
 Asp Gly Pro Ser Thr Asp Leu Gly Glu Leu Ala Leu Gly Gln Asn Met
 785 790 795 800
 Arg Val Ala Phe Met Pro Trp Asn Gly Tyr Asn Phe Glu Asp Ser Ile
 805 810 815
 Leu Val Ser Glu Arg Val Val Gln Glu Asp Arg Phe Thr Thr Ile His
 820 825 830
 Ile Gln Glu Leu Ala Cys Val Ser Arg Asp Thr Lys Leu Gly Pro Glu
 835 840 845

ES 2 807 448 T3

Glu Ile Thr Ala Asp Ile Pro Asn Val Gly Glu Ala Ala Leu Ser Lys
 850 855 860

Leu Asp Glu Ser Gly Ile Val Tyr Ile Gly Ala Glu Val Thr Gly Gly
 865 870 875 880

Asp Ile Leu Val Gly Lys Val Thr Pro Lys Gly Glu Thr Gln Leu Thr
 885 890 895

Pro Glu Glu Lys Leu Leu Arg Ala Ile Phe Gly Glu Lys Ala Ser Asp
 900 905 910

Val Lys Asp Ser Ser Leu Arg Val Pro Asn Gly Val Ser Gly Thr Val
 915 920 925

Ile Asp Val Gln Val Phe Thr Arg Asp Gly Val Glu Lys Asp Lys Arg
 930 935 940

Ala Leu Glu Ile Glu Glu Met Gln Leu Lys Gln Ala Lys Lys Asp Leu
 945 950 955 960

Ser Glu Glu Leu Gln Ile Leu Glu Ala Gly Leu Phe Ser Arg Ile Arg
 965 970 975

Ala Val Leu Val Ala Gly Gly Val Glu Ala Glu Lys Leu Asp Lys Leu
 980 985 990

Pro Arg Asp Arg Trp Leu Glu Leu Gly Leu Thr Asp Glu Glu Lys Gln
 995 1000 1005

Asn Gln Leu Glu Gln Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Glu Leu Lys His
 1010 1015 1020

Glu Phe Glu Lys Lys Leu Glu Ala Lys Arg Arg Lys Ile Thr Gln
 1025 1030 1035

Gly Asp Asp Leu Ala Pro Gly Val Leu Lys Ile Val Lys Val Tyr
 1040 1045 1050

Leu Ala Val Lys Arg Arg Ile Gln Pro Gly Asp Lys Met Ala Gly
 1055 1060 1065

Arg His Gly Asn Lys Gly Val Ile Ser Lys Ile Asn Pro Ile Glu
 1070 1075 1080

Asp Met Pro Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Pro Val Asp Ile Val Leu
 1085 1090 1095

ES 2 807 448 T3

Asn Pro Leu Gly Val Pro Ser Arg Met Asn Ile Gly Gln Ile Leu
 1100 1105 1110

Glu Thr His Leu Gly Met Ala Ala Lys Gly Ile Gly Asp Lys Ile
 1115 1120 1125

Asn Ala Met Leu Lys Gln Gln Gln Glu Val Ala Lys Leu Arg Glu
 1130 1135 1140

Phe Ile Gln Arg Ala Tyr Asp Leu Gly Ala Asp Val Arg Gln Lys
 1145 1150 1155

Val Asp Leu Ser Thr Phe Ser Asp Glu Glu Val Met Arg Leu Ala
 1160 1165 1170

Glu Asn Leu Arg Lys Gly Met Pro Ile Ala Thr Pro Val Phe Asp
 1175 1180 1185

Gly Ala Lys Glu Ala Glu Ile Lys Glu Leu Leu Lys Leu Gly Asp
 1190 1195 1200

Leu Pro Thr Ser Gly Gln Ile Arg Leu Tyr Asp Gly Arg Thr Gly
 1205 1210 1215

Glu Gln Phe Glu Arg Pro Val Thr Val Gly Tyr Met Tyr Met Leu
 1220 1225 1230

Lys Leu Asn His Leu Val Asp Asp Lys Met His Ala Arg Ser Thr
 1235 1240 1245

Gly Ser Tyr Ser Leu Val Thr Gln Gln Pro Leu Gly Gly Lys Ala
 1250 1255 1260

Gln Phe Gly Gly Gln Arg Phe Gly Glu Met Glu Val Trp Ala Leu
 1265 1270 1275

Glu Ala Tyr Gly Ala Ala Tyr Thr Leu Gln Glu Met Leu Thr Val
 1280 1285 1290

Lys Ser Asp Asp Val Asn Gly Arg Thr Lys Met Tyr Lys Asn Ile
 1295 1300 1305

Val Asp Gly Asn His Gln Met Glu Pro Gly Met Pro Glu Ser Phe
 1310 1315 1320

Asn Val Leu Leu Lys Glu Ile Arg Ser Leu Gly Ile Asn Ile Glu

ES 2 807 448 T3

1325

1330

1335

Leu Glu Asp Glu
1340

<210> 26
<211> 548
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 26

5

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

Asp Asn Thr Glu Tyr Tyr Leu Leu Thr Ser Asp Tyr Val Ser Val Ala
20 25 30

Asp Phe Asp Gly Glu Thr Ile Leu Lys Val Glu Pro Glu Ala Leu Thr
35 40 45

Leu Leu Ala Gln Gln Ala Phe His Asp Ala Ser Phe Met Leu Arg Pro
50 55 60

Ala His Gln Lys Gln Val Ala Ala Ile Leu His Asp Pro Glu Ala Ser
65 70 75 80

Glu Asn Asp Lys Tyr Val Ala Leu Gln Phe Leu Arg Asn Ser Glu Ile
85 90 95

Ala Ala Lys Gly Val Leu Pro Thr Cys Gln Asp Thr Gly Thr Ala Ile
100 105 110

Ile Val Gly Lys Lys Gly Gln Arg Val Trp Thr Gly Gly Gly Asp Glu
115 120 125

Glu Thr Leu Ser Lys Gly Val Tyr Asn Thr Tyr Ile Glu Asp Asn Leu
130 135 140

Arg Tyr Ser Gln Asn Ala Ala Leu Asp Met Tyr Lys Glu Val Asn Thr
145 150 155 160

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

Glu Tyr Lys Phe Leu Cys Val Ala Lys Gly Gly Gly Ser Ala Asn Lys
180 185 190

10

Thr Tyr Leu Tyr Gln Glu Thr Lys Ala Leu Leu Thr Pro Gly Lys Leu

ES 2 807 448 T3

Asp Leu Leu Gln Ser His Gly Gly Ser Met Ile Met Leu Ala Lys Gly
 450 455 460

Asn Arg Ser Gln Gln Val Thr Asp Ala Cys His Lys His Gly Gly Phe
 465 470 475 480

Tyr Leu Gly Ser Ile Gly Gly Pro Ala Ala Val Leu Ala Gln Gln Ser
 485 490 495

Ile Lys His Leu Glu Cys Val Ala Tyr Pro Glu Leu Gly Met Glu Ala
 500 505 510

Ile Trp Lys Ile Glu Val Glu Asp Phe Pro Ala Phe Ile Leu Val Asp
 515 520 525

Asp Lys Gly Asn Asp Phe Phe Gln Gln Ile Val Asn Lys Gln Cys Ala
 530 535 540

Asn Cys Thr Lys
 545

<210> 27
 <211> 518
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 27

Met Ile Pro Asp Val Ser Gln Ala Leu Ala Trp Leu Glu Lys His Pro
 1 5 10 15

Gln Ala Leu Lys Gly Ile Gln Arg Gly Leu Glu Arg Glu Thr Leu Arg
 20 25 30

Val Asn Ala Asp Gly Thr Leu Ala Thr Thr Gly His Pro Glu Ala Leu
 35 40 45

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

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

Thr Phe Met Arg Asp Leu His Arg Tyr Thr Ala Arg Asn Met Gly Asp
 85 90 95

Glu Arg Met Trp Pro Leu Ser Met Pro Cys Tyr Ile Ala Glu Gly Gln
 100 105 110

10

ES 2 807 448 T3

Asp Ile Glu Leu Ala Gln Tyr Gly Thr Ser Asn Thr Gly Arg Phe Lys
 115 120 125
 Thr Leu Tyr Arg Glu Gly Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Ala Leu Met Gln
 130 135 140
 Thr Ile Ser Gly Val His Tyr Asn Phe Ser Leu Pro Met Ala Phe Trp
 145 150 155 160
 Gln Ala Lys Cys Gly Asp Ile Ser Gly Ala Asp Ala Lys Glu Lys Ile
 165 170 175
 Ser Ala Gly Tyr Phe Arg Val Ile Arg Asn Tyr Tyr Arg Phe Gly Trp
 180 185 190
 Val Ile Pro Tyr Leu Phe Gly Ala Ser Pro Ala Ile Cys Ser Ser Phe
 195 200 205
 Leu Gln Gly Lys Pro Thr Ser Leu Pro Phe Glu Lys Thr Glu Cys Gly
 210 215 220
 Met Tyr Tyr Leu Pro Tyr Ala Thr Ser Leu Arg Leu Ser Asp Leu Gly
 225 230 235 240
 Tyr Thr Asn Lys Ser Gln Ser Asn Leu Gly Ile Thr Phe Asn Asp Leu
 245 250 255
 Tyr Glu Tyr Val Ala Gly Leu Lys Gln Ala Ile Lys Thr Pro Ser Glu
 260 265 270
 Glu Tyr Ala Lys Ile Gly Ile Glu Lys Asp Gly Lys Arg Leu Gln Ile
 275 280 285
 Asn Ser Asn Val Leu Gln Ile Glu Asn Glu Leu Tyr Ala Pro Ile Arg
 290 295 300
 Pro Lys Arg Val Thr Arg Ser Gly Glu Ser Pro Ser Asp Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Arg Gly Gly Ile Glu Tyr Ile Glu Val Arg Ser Leu Asp Ile Asn Pro
 325 330 335
 Phe Ser Pro Ile Gly Val Asp Glu Gln Gln Val Arg Phe Leu Asp Leu
 340 345 350
 Phe Met Val Trp Cys Ala Leu Ala Asp Ala Pro Glu Met Ser Ser Ser
 355 360 365

ES 2 807 448 T3

Glu Leu Ala Cys Thr Arg Val Asn Trp Asn Arg Val Ile Leu Glu Gly
 370 375 380

Arg Lys Pro Gly Leu Thr Leu Gly Ile Gly Cys Glu Thr Ala Gln Phe
 385 390 395 400

Pro Leu Pro Gln Val Gly Lys Asp Leu Phe Arg Asp Leu Lys Arg Val
 405 410 415

Ala Gln Thr Leu Asp Ser Ile Asn Gly Gly Glu Ala Tyr Gln Lys Val
 420 425 430

Cys Asp Glu Leu Val Ala Cys Phe Asp Asn Pro Asp Leu Thr Phe Ser
 435 440 445

Ala Arg Ile Leu Arg Ser Met Ile Asp Thr Gly Ile Gly Gly Thr Gly
 450 455 460

Lys Ala Phe Ala Glu Ala Tyr Arg Asn Leu Leu Arg Glu Glu Pro Leu
 465 470 475 480

Glu Ile Leu Arg Glu Glu Asp Phe Val Ala Glu Arg Glu Ala Ser Glu
 485 490 495

Arg Arg Gln Gln Glu Met Glu Ala Ala Asp Thr Glu Pro Phe Ala Val
 500 505 510

Trp Leu Glu Lys His Ala
 515

<210> 28
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 28

Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala
 1 5 10 15

Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Val Asp Phe His Gly Tyr Ala
 20 25 30

Arg Ser Gly Ile Gly Trp Thr Gly Ser Gly Gly Glu Gln Gln Cys Phe
 35 40 45

Gln Thr Thr Gly Ala Gln Ser Lys Tyr Arg Leu Gly Asn Glu Cys Glu
 50 55 60

10

ES 2 807 448 T3

Thr Tyr Ala Glu Leu Lys Leu Gly Gln Glu Val Trp Lys Glu Gly Asp
 65 70 75 80
 Lys Ser Phe Tyr Phe Asp Thr Asn Val Ala Tyr Ser Val Ala Gln Gln
 85 90 95
 Asn Asp Trp Glu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Arg Glu Ala Asn Val Gln
 100 105 110
 Gly Lys Asn Leu Ile Glu Trp Leu Pro Gly Ser Thr Ile Trp Ala Gly
 115 120 125
 Lys Arg Phe Tyr Gln Arg His Asp Val His Met Ile Asp Phe Tyr Tyr
 130 135 140
 Trp Asp Ile Ser Gly Pro Gly Ala Gly Leu Glu Asn Ile Asp Val Gly
 145 150 155 160
 Phe Gly Lys Leu Ser Leu Ala Ala Thr Arg Ser Ser Glu Ala Gly Gly
 165 170 175
 Ser Ser Ser Phe Ala Ser Asn Asn Ile Tyr Asp Tyr Thr Asn Glu Thr
 180 185 190
 Ala Asn Asp Val Phe Asp Val Arg Leu Ala Gln Met Glu Ile Asn Pro
 195 200 205
 Gly Gly Thr Leu Glu Leu Gly Val Asp Tyr Gly Arg Ala Asn Leu Arg
 210 215 220
 Asp Asn Tyr Arg Leu Val Asp Gly Ala Ser Lys Asp Gly Trp Leu Phe
 225 230 235 240
 Thr Ala Glu His Thr Gln Ser Val Leu Lys Gly Phe Asn Lys Phe Val
 245 250 255
 Val Gln Tyr Ala Thr Asp Ser Met Thr Ser Gln Gly Lys Gly Leu Ser
 260 265 270
 Gln Gly Ser Gly Val Ala Phe Asp Asn Glu Lys Phe Ala Tyr Asn Ile
 275 280 285
 Asn Asn Asn Gly His Met Leu Arg Ile Leu Asp His Gly Ala Ile Ser
 290 295 300
 Met Gly Asp Asn Trp Asp Met Met Tyr Val Gly Met Tyr Gln Asp Ile
 305 310 315 320

ES 2 807 448 T3

Asn Trp Asp Asn Asp Asn Gly Thr Lys Trp Trp Thr Val Gly Ile Arg
 325 330 335

Pro Met Tyr Lys Trp Thr Pro Ile Met Ser Thr Val Met Glu Ile Gly
 340 345 350

Tyr Asp Asn Val Glu Ser Gln Arg Thr Gly Asp Lys Asn Asn Gln Tyr
 355 360 365

Lys Ile Thr Leu Ala Gln Gln Trp Gln Ala Gly Asp Ser Ile Trp Ser
 370 375 380

Arg Pro Ala Ile Arg Val Phe Ala Thr Tyr Ala Lys Trp Asp Glu Lys
 385 390 395 400

Trp Gly Tyr Asp Tyr Thr Gly Asn Ala Asp Asn Asn Ala Asn Phe Gly
 405 410 415

Lys Ala Val Pro Ala Asp Phe Asn Gly Gly Ser Phe Gly Arg Gly Asp
 420 425 430

Ser Asp Glu Trp Thr Phe Gly Ala Gln Met Glu Ile Trp Trp
 435 440 445

<210> 29
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 29

Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala
 1 5 10 15

Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Val Asp Phe His Gly Tyr Ala
 20 25 30

Arg Ser Gly Ile Gly Trp Thr Gly Ser Gly Gly Glu Gln Gln Cys Phe
 35 40 45

Gln Thr Thr Gly Ala Gln Ser Lys Tyr Arg Leu Gly Asn Glu Cys Glu
 50 55 60

Thr Tyr Ala Glu Leu Lys Leu Gly Gln Glu Val Trp Lys Glu Gly Asp
 65 70 75 80

Lys Ser Phe Tyr Phe Asp Thr Asn Val Ala Tyr Ser Val Ala Gln Gln
 85 90 95

10

ES 2 807 448 T3

Asn Asp Trp Glu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Arg Glu Ala Asn Val
 100 105 110

5 <210> 30
 <211> 1476
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400> 30

atggcggtaa cgcaaacagc ccaggcctgt gacctgttca ttttcggcgc gaaaggcgac 60
 cttgcgcgtc gtaaattgct gccttccctg tatcaactgg aaaaagccgg tcagctcaac 120
 ccggacaccc ggattatcgg cgtagggcgt gctgactggg ataaagcggc atataccaaa 180
 gttgtccgcg aggcgctcga aactttcatg aaagaaacca ttgatgaagg tttatgggac 240
 accctgagtg cacgtctgga tttttgtaat ctcgatgtca atgacactgc tgcattcagc 300
 cgtctcggcg cgatgctgga tcaaaaaaat cgtatcacca ttaactactt tgccatgccg 360
 cccagcactt ttggcgcaat ttgcaaaggg cttggcgagg caaaactgaa tgctaaaccg 420
 gcacgcgtag tcatggagaa accgctgggg acgtcgctgg cgacctcgca ggaaatcaat 480
 gatcaggttg gcgaatactt cgaggagtgc caggtttacc gtatcgacca ctatcttggc 540
 aaagaaacgg tgctgaacct gttggcgctg cgttttgcta actccctggt tgtgaataac 600
 tgggacaatc gcaccattga tcatgttgag attaccgtgg cagaagaagt ggggatcgaa 660
 gggcgctggg gctattttga taaagccggt cagatgcgcg acatgatcca gaaccacctg 720
 ctgcaaattc tttgcatgat tgcgatgtct ccgccgtctg acctgagcgc agacagcatc 780
 cgcgatgaaa aagtgaaagt actgaagtct ctgcgccgca tcgaccgctc caacgtacgc 840
 gaaaaaacccg tacgcgggca atatactgcg ggcttcgccc agggcaaaaa agtgccggga 900
 tatctggaag aagagggcgc gaacaagagc agcaatacag aaactttcgt ggcgatccgc 960
 gtcgacattg ataactggcg ctgggccggt gtgccattct acctgcgtac tggtaaactg 1020
 ctgccgacca aatgttctga agtcgtggtc tatttcaaaa cacctgaact gaatctgttt 1080
 aaagaatcgt ggcaggatct gccgcagaat aaactgacta tccgtctgca acctgatgaa 1140
 ggcgtggata tccaggctact gaataaagtt cctggccttg accacaaaca taacctgcaa 1200
 atcaccaagc tggatctgag ctattcagaa acctttaatc agacgcatct ggcggatgcc 1260
 tatgaacggt tgctgctgga aaccatgctg ggtattcagg cactgtttgt acgtcgcgac 1320
 gaagtggaag aagcctggaa atgggtagac tccattactg aggcgtgggc gatggacaat 1380
 gatgcgccga aaccgtatca ggccggaacc tggggacccg ttgcctcggc ggcgatgatt 1440
 10 acccgtgatg gtcgttcctg gaatgagttt gagtaa 1476

<210> 31
 <211> 439

ES 2 807 448 T3

<212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 31

5

```

Met Thr His Gln Leu Arg Ser Arg Asp Ile Ile Ala Leu Gly Phe Met
 1          5          10          15

Thr Phe Ala Leu Phe Val Gly Ala Gly Asn Ile Ile Phe Pro Pro Met
          20          25          30

Val Gly Leu Gln Ala Gly Glu His Val Trp Thr Ala Ala Phe Gly Phe
          35          40          45

Leu Ile Thr Ala Val Gly Leu Pro Val Leu Thr Val Val Ala Leu Ala
 50          55          60

Lys Val Gly Gly Gly Val Asp Ser Leu Ser Thr Pro Ile Gly Lys Val
 65          70          75          80

Ala Gly Val Leu Leu Ala Thr Val Cys Tyr Leu Ala Val Gly Pro Leu
          85          90          95

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

Pro Leu Thr Gly Asp Ser Ala Leu Pro Leu Phe Ile Tyr Ser Leu Val
          115          120          125

Tyr Phe Ala Ile Val Ile Leu Val Ser Leu Tyr Pro Gly Lys Leu Leu
 130          135          140

Asp Thr Val Gly Asn Phe Leu Ala Pro Leu Lys Ile Ile Ala Leu Val
 145          150          155          160

Ile Leu Ser Val Ala Ala Ile Val Trp Pro Ala Gly Ser Ile Ser Thr
          165          170          175

Ala Thr Glu Ala Tyr Gln Asn Ala Ala Phe Ser Asn Gly Phe Val Asn
          180          185          190

Gly Tyr Leu Thr Met Asp Thr Leu Gly Ala Met Val Phe Gly Ile Val
          195          200          205

Ile Val Asn Ala Ala Arg Ser Arg Gly Val Thr Glu Ala Arg Leu Leu
 210          215          220
  
```

ES 2 807 448 T3

Thr Arg Tyr Thr Val Trp Ala Gly Leu Met Ala Gly Val Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Leu Leu Tyr Leu Ala Leu Phe Arg Leu Gly Ser Asp Ser Ala Ser Leu
 245 250 255

Val Asp Gln Ser Ala Asn Gly Ala Ala Ile Leu His Ala Tyr Val Gln
 260 265 270

His Thr Phe Gly Gly Gly Gly Ser Phe Leu Leu Ala Ala Leu Ile Phe
 275 280 285

Ile Ala Cys Leu Val Thr Ala Val Gly Leu Thr Cys Ala Cys Ala Glu
 290 295 300

Phe Phe Ala Gln Tyr Val Pro Leu Ser Tyr Arg Thr Leu Val Phe Ile
 305 310 315 320

Leu Gly Gly Phe Ser Met Val Val Ser Asn Leu Gly Leu Ser Gln Leu
 325 330 335

Ile Gln Ile Ser Val Pro Val Leu Thr Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Ile
 340 345 350

Ala Leu Val Val Leu Ser Phe Thr Arg Ser Trp Trp His Asn Ser Ser
 355 360 365

Arg Val Ile Ala Pro Pro Met Phe Ile Ser Leu Leu Phe Gly Ile Leu
 370 375 380

Asp Gly Ile Lys Ala Ser Ala Phe Ser Asp Ile Leu Pro Ser Trp Ala
 385 390 395 400

Gln Arg Leu Pro Leu Ala Glu Gln Gly Leu Ala Trp Leu Met Pro Thr
 405 410 415

Val Val Met Val Val Leu Ala Ile Ile Trp Asp Arg Ala Ala Gly Arg
 420 425 430

Gln Val Thr Ser Ser Ala His
 435

<210> 32
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 32

ES 2 807 448 T3

Met Thr His Gln Leu Arg Ser Arg Asp Ile Ile Ala Leu Gly Phe Met
1 5 10 15

Thr Phe Ala Leu Phe Val Gly Ala Gly Asn Ile Ile Phe Pro Pro Met
20 25 30

Val Gly Leu Gln Ala Gly Glu His Val Trp Thr Ala Ala Phe Gly Phe
35 40 45

Leu Ile Thr Ala Val Gly Leu Pro Val Leu Thr Val Val Ala Leu Ala
50 55 60

Lys Val Gly Gly Gly Val Asp Ser Leu Ser Thr Pro Ile Gly Lys Val
65 70 75 80

Ala Gly Val Leu Leu Ala Thr Val Cys Tyr Leu Ala Val Gly Pro Leu
85 90 95

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

Pro Leu Thr Gly Asp Ser Ala Leu Pro Leu Phe Ile Tyr Ser Leu Val
115 120 125

Tyr Phe Ala Ile Val Ile Leu Val Ser Leu Tyr Pro Gly Lys Leu Leu
130 135 140

Asp Thr Val Gly Asn Phe Leu Ala Pro Leu Lys Ile Ile Ala Leu Val
145 150 155 160

Ile Leu Ser Val Ala Ala Ile Val Trp Pro Ala Gly Ser Ile Ser Thr
165 170 175

Ala Thr Glu Ala Tyr Gln Asn Ala Ala Phe Ser Asn Gly Phe Val Asn
180 185 190

Gly Tyr Leu Thr Met Asp Thr Leu Gly Ala Met Val Phe Gly Ile Val
195 200 205

Ile Val Asn Ala Ala Arg Ser Arg Gly Val Thr Glu Ala Arg Leu Leu
210 215 220

Thr Arg Tyr Thr Val Trp Ala Gly Leu Met Ala Gly Val Gly Leu Thr
225 230 235 240

Leu Leu Tyr Leu Ala Leu Phe Arg Leu Gly Ser Asp Ser Ala Ser Leu
245 250 255

ES 2 807 448 T3

Val Asp Gln Ser Ala Asn Gly Ala Ala Ile Leu His Ala Tyr Val Gln
 260 265 270

His Thr Phe Gly Gly Gly Gly Ser Phe Leu Leu Ala Ala Leu Ile Phe
 275 280 285

Ile Ala Cys Leu Val Thr Ala Val Gly Leu Thr Cys Ala Cys Ala Glu
 290 295 300

Phe Phe Ala Gln
 305

5 <210> 33
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 33

gcgctgttat tagttcgta ctggaagtcc agtcaccttg tcaggagtat tatcgtggtg 60

taggctggag ctgcttcg 78

15 <210> 34
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 34

cgcccatccg ttgcagatgg gcgagtaaga agtattagtc aactggacc atatgaatat 60

25 cctccttagt tcc 73

30 <210> 35
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

35 <400> 35

cgctttcggg cggcgcttcc tccgttttaa cgcgatgtat ttcctatggt gtaggctgga 60

gctgcttcg 69

40 <210> 36
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

ES 2 807 448 T3

	<400> 36	
	ggcctcgcaa aacgaggcct ttggagagcg attaatcgca ggcaaccata tgaatadcct	60
5	ccttagttcc	70
	<210> 37	
	<211> 67	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 37	
	cgttccgctc cacttcaactg aacggcaatc cgaggggtgtg gatatggtgt aggctggagc	60
	tgcttcg	67
	<210> 38	
20	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador	
	<400> 38	
	gtgcacccaa ggatgaaagc tgacagcaat gtcagccgca gaccaccata tgaatadcct	60
	ccttagttcc	70
30	<210> 39	
	<211> 71	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 39	
	gtagctgag tcaggagatg cggatgttaa agcgtgaaat gaacattgcc gtgtaggctg	60
40	gagctgcttc g	71
	<210> 40	
	<211> 73	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 40	
	caacgagcac attgacagca aatcaccgtt tcgcttatgc gtaaaccggc atatgaatat	60
	cctccttagt tcc	73
55	<210> 41	
	<211> 30	

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador	
	<400> 41	
10	gcgctgttat tagttcgтта ctggaagtcc	30
	<210> 42 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador	
	<400> 42	
20	cgcccatccg ttgcagatgg gc	22
	<210> 43 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador	
	<400> 43	
30	cgctttcggg cggcgcttcc tc	22
	<210> 44 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
	<400> 44	
40	ggcctcgcaa aacgaggcct ttgg	24
	<210> 45 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador	
	<400> 45	
50	cgttccgctc cacttcactg aacgg	25
	<210> 46 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<400> 45	
60	cgttccgctc cacttcactg aacgg	25
	<210> 46 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador	

	<400> 46	
5	gtgcacccaa ggatgaaagc tgacagc	27
	<210> 47	
	<211> 28	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 47	
15	gttagctgag tcaggagatg cggatggt	28
	<210> 48	
	<211> 28	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 48	
	caacgagcac attgacagca aatcaccg	28
30	<210> 49	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 49	
40	ggcccatggc aaaggtatcg ctggag	26
	<210> 50	
	<211> 33	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 50	
	attgcggccg cttagtacag cagacgggcg cga	33
55	<210> 51	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador	
	<400> 51	
65	ggcccatggc taacattacc tggtgcg	27

ES 2 807 448 T3

<210> 52
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 52
 10 **gcccaagcttt tattacttct gattcaggct gcc** 33
 <210> 53
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador
 20
 <400> 53
gccttaatta attattactt ctgattcagg ctgcc 35
 25
 <210> 54
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 54
 35 **ggccatatga tggctcaaat cttcaatttt agttctgg** 38
 <210> 55
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador
 45
 <400> 55
gccttaatta atcattaacc gtgacggcgt tccaac 36
 50
 <210> 56
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 56
 60 **ccgcatatgt cgcgaaaaga tggggtg** 27
 <210> 57
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 57	
5	gccttaatta atgatgatga tgatgatgac ttcccacott taccgottta cgcc	54
	<210> 58	
	<211> 26	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 58	
	ccgccatggc gcgaaaagat ggggtg	26
20	<210> 59	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 59	
30	cgagcagggc gtcgctatcg ccgcgcaata	30
	<210> 60	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
40	<400> 60	
	tattgcgagg cgatagcgac gccctgctcg	30
45	<210> 61	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 61	
	ctgatcacat cgctgaagct cgtccggggcg tgc	33
55	<210> 62	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 62	
65		

	gcacgcccgg acgagcttca gcgatgtgca tcag	34
5	<210> 63 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador <400> 63	
	caaggtatta ttctgtcatg gcggtggtcg cg	32
15	<210> 64 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador <400> 64	
25	cgcgaccacc gccatgacag aataatacct tg	32
30	<210> 65 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador <400> 65	
	atgcgagtgt tgaagttcgg cg	22
40	<210> 66 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador <400> 66	
50	tcagactcct aacttccatg agaggg	26
55	<210> 67 <211> 73 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador <400> 67	
	atgcgagtgt tgaagttcgg cggtacatca gtggcaaatg cagaacgttt aaaatgagac	60
	gttgatcggc acg	73
	<210> 68	

ES 2 807 448 T3

	<211> 75 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador <400> 68	
	tcagactcct aacttccatg agagggtacg tagcagatca gcaaagacac caaagggaaa	60
10	actgtccata tgcac	75
	<210> 69 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador	
20	<400> 69	
	gcttgacttc ttccataaca acgtaagtgc gcgtcccgtt aaccccaggc agacgcagca	60
	gggtttc	67
25	<210> 70 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 70	
	ccaaccggct gaatcatgaa ttcttgaatg togagattat tadcagcgtg ctcaccaccg	60
35	ttgatgatg	69
	<210> 71 <211> 63 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador	
45	<400> 71	
	ctcaacttgc aggtagaaga tgaaacgagg aaagagaggg tccgccgcgg cgaagtggtc	60
	ggc	63
50	<210> 72 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<400> 72	

ES 2 807 448 T3

	cagctcaatc cccacgaaag ctaatacggc aacttgaaaa cgggcaaaga agccacttaa	60
	acctttc	67
5	<210> 73 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador <400> 73	
	gcatcatggt tgcgcgtggc gacctcggcg tttagtgacc ctaaactctc gcccagaaga	60
	tgatga	66
15	<210> 74 <211> 63 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador <400> 74	
	gatacgacgt ttgtgcgtaa tttctgagag gagattatct tggccataa actgagacag	60
25	ctg	63
30	<210> 75 <211> 62 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador <400> 75	
	ctcgtgaaggc atttagcggc ggtaatggtt atcattaggc tattaactt tgatgttaaa	60
	tg	62
40	<210> 76 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador <400> 76	
	ggtgagatta atcggaccaa cggagaaggc attgtgttgg tatgcaaacg tcacgttacg	60
50	cagctccagc	70
55	<210> 77 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 807 448 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 77
 5 **gagatggtat caccagtgcg gagattaaat cttagtatct gagaagggga aacgtagatg** 60
tcatcag 67

 <210> 78
 <211> 55
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 78

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagcggatgat ttcgactacc tgttg 55
 20 <210> 79
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 79

gtctcgtggg ctccgagatg tgtataagag acagggcgcgt cttataaacc agacgat 57
 30 <210> 80
 <211> 56
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 80

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggctgtac gagcacatcg ctgaac 56
 45 <210> 81
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 81

gtctcgtggg ctccgagatg tgtataagag acagcccatg cggatggctt ctttcac 57
 55 <210> 82
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador

ES 2 807 448 T3

	<400> 82	
	tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggacagtc tggcgacgtg gttgct	56
5	<210> 83 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 83	
15	gtctcgtggg ctccggagatg tgtataagag acagtatcga caagacaact cggcagcg	58
20	<210> 84 <211> 55 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
25	<400> 84	
	tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggggaagcg tcattcgcgc atttg	55
30	<210> 85 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
	<400> 85	
40	gtctcgtggg ctccggagatg tgtataagag acagggtaat cgcgcgtggc agtg	54
45	<210> 86 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
50	<400> 86	
	tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagggcctca acaacttcga cga	53
55	<210> 87 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
60	<400> 87	
	gtctcgtggg ctccggagatg tgtataagag acaggaatcc agcatctggg tcgc	54
65	<210> 88	

ES 2 807 448 T3

<211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 88

10 **tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagcaacgcc aagccgattt ccg** 53

<210> 89
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

20 <400> 89

gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acaggtctcg aacttcgaag cctgc 55

<210> 90
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador

30 <400> 90

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggctggta gaagctcaac ggac 54

35 <210> 91
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador

45 <400> 91

gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acagtgctgc ggcatcaaaa actcg 55

<210> 92
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador

55 <400> 92

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggcctttc aaagcagagt ttccgc 56

60 <210> 93
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Cebador
 <400> 93

5 **gtctcgtggg ctcgagatg tgtataagag acagctaccg ttgccgcaa tcag** 54

<210> 94
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

15 <400> 94

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggcaggat ggatttggtt tcctcc 56

<210> 95
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

25 <400> 95

gtctcgtggg ctcgagatg tgtataagag acaggcagcg caaatagcg ttcacc 56

30 <210> 96
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador

40 <400> 96

gcgccatggg agtggtgaag ttcggcg 27

<210> 97
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

50 <400> 97

gccaagcttt cagactccta acttccatga gaggg 35

55 <210> 98
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)

65

	<223> m es a o c	
	<220>	
5	<221> misc_feature <222> (18)..(19) <223> n es a, c, g o t	
	<400> 98	
10	cgcagaaact gatgctmnt tcggaagatg attgcg	36
	<210> 99 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15		
	<220> <223> Cebador	
20		
	<220> <221> misc_feature <222> (17)..(17) <223> m es a o c	
25		
	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(19) <223> n es a, c, g o t	
30		
	<400> 99	
	cgcagaaact gatgctmnt tcggaagatg attgcg	36
	<210> 100 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35		
	<220> <223> Cebador	
40		
	<220> <221> misc_feature <222> (19)..(20) <223> n es a, c, g o t	
45		
	<400> 100	
	caatcatctt ccgaatacnn katcagtttc tgcgttcc	38
50		
	<210> 101 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55		
	<220> <223> Cebador	
60		
	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(18) <223> m es a o c	
65		
	<220> <221> misc_feature <222> (19)..(20)	

<223> n e s a, c, g o t
 <400> 101

5 **ggaacgcaga aactgatmnn gtattcggaa gatgattg** 38

<210> 102
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> n e s a, c, g o t

20 <400> 102

ccgaatacag catcnkttc tgcgttccac 30

25 <210> 103
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 35 <223> m e s a o c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 40 <223> n e s a, c, g o t

<400> 103
 gtggaacgca gaamngatg ctgtattcgg 30

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* que se ha modificado para inactivar los genes *sdaA*, *sdaB*, *tdcG* y *glyA*.
2. La bacteria de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha bacteria se ha modificado adicionalmente para sobreexpresar una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, una fosfoserina fosfatasa y una fosfoserina aminotransferasa.
3. La bacteria de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha bacteria es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 6,25 g/l.
4. La bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha bacteria es capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo que comprende L-serina a una concentración de al menos aproximadamente 6,25 g/l a una velocidad de crecimiento de al menos 0,1 h⁻¹ durante el crecimiento exponencial.
5. La bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha bacteria comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una o más sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en Y356, S357 y S359.
6. La bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha bacteria comprende en el gen *thrA* una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición Y356, una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición S357 y/o una o más sustituciones de nucleótidos que dan como resultado una sustitución de aminoácidos en el polipéptido codificado en la posición S359; en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R, Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F, S357H, S357K, S357I y S357M; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.
7. La bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha bacteria expresa un polipéptido codificado por el gen *thrA*, en donde dicho polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en Y356C, S357R y S359R.
8. La bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha bacteria expresa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, que comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones Y356, S357 y/o S359, en donde la sustitución en la posición Y356 se selecciona entre el grupo que consiste en Y356C, Y356T, Y356V, Y356S, Y356W, Y356Q, Y356G, Y356N, Y356D, Y356E, Y356F, Y356A, Y356I, Y356P, Y356H, Y356R y Y356L; la sustitución en la posición S357 se selecciona entre el grupo que consiste en S357R, S357V, S357P, S357G, S357L, S357Y, S357A, S357N, S357F y S357H; y la sustitución en la posición S359 se selecciona entre el grupo que consiste en S359R, S359G, S359M, S359F, S359T, S359P, S359V, S359Q, S359A, S359C, S359K, S359E y S359L.
9. La bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha bacteria se ha modificado adicionalmente para sobreexpresar el gen *ydeD*.
10. La bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha bacteria comprende una o más mutaciones génicas seleccionadas entre el grupo que consiste en: una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *lrp* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos D143G en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *rho* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos R87L en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *eno* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V164L en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *argP* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos Q132K en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *tufA* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos G19V en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *cycA* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos I220V en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *rpe* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos I202T en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *yojI* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos D334H en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *hyaF* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos V120G en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *pykF* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos E250* en el polipéptido codificado, donde * indica un codón de parada, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *malT* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos Q420* en el polipéptido codificado, donde * indica un codón de parada, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *rpoB* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos P520L en el polipéptido codificado, una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *fumB* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos T218P en el polipéptido codificado, una o más sustituciones en el gen *gshA* que dan como resultado

la sustitución de aminoácidos A178V en el polipéptido codificado y una o más sustituciones de nucleótidos en el gen *lamB* que dan como resultado la sustitución de aminoácidos Q112* en el polipéptido codificado, donde * indica un codón de parada.

- 5 11. La bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha bacteria pertenece al género *Escherichia*.
12. La bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha bacteria es *Escherichia coli*.
- 10 13. Un método para producir L-serina o un derivado de L-serina, comprendiendo el método cultivar una bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en un medio de cultivo.
- 15 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el derivado de L-serina se selecciona entre el grupo que consiste en L-cisteína, L-metionina, L-glicina, O-acetilserina, L-triptófano, tiamina, etanolamina y etilenglicol.

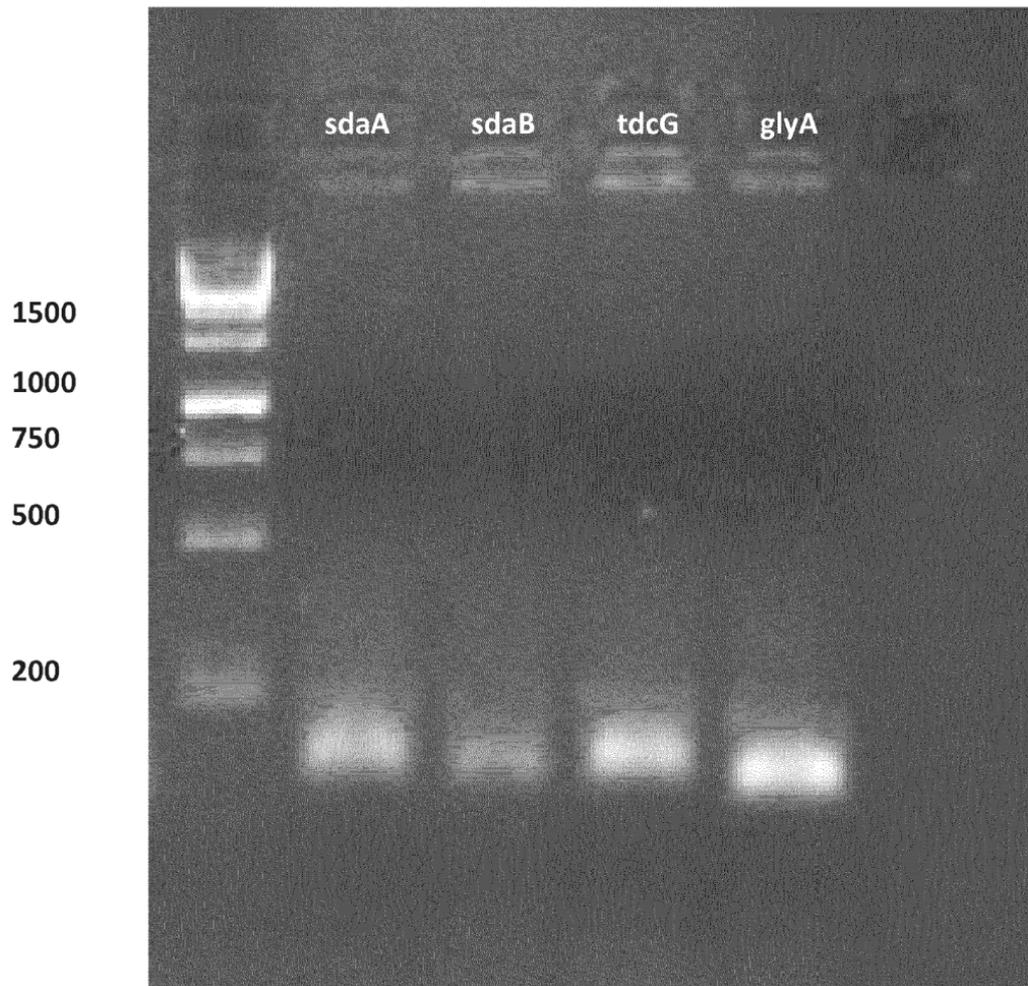


Figura 1

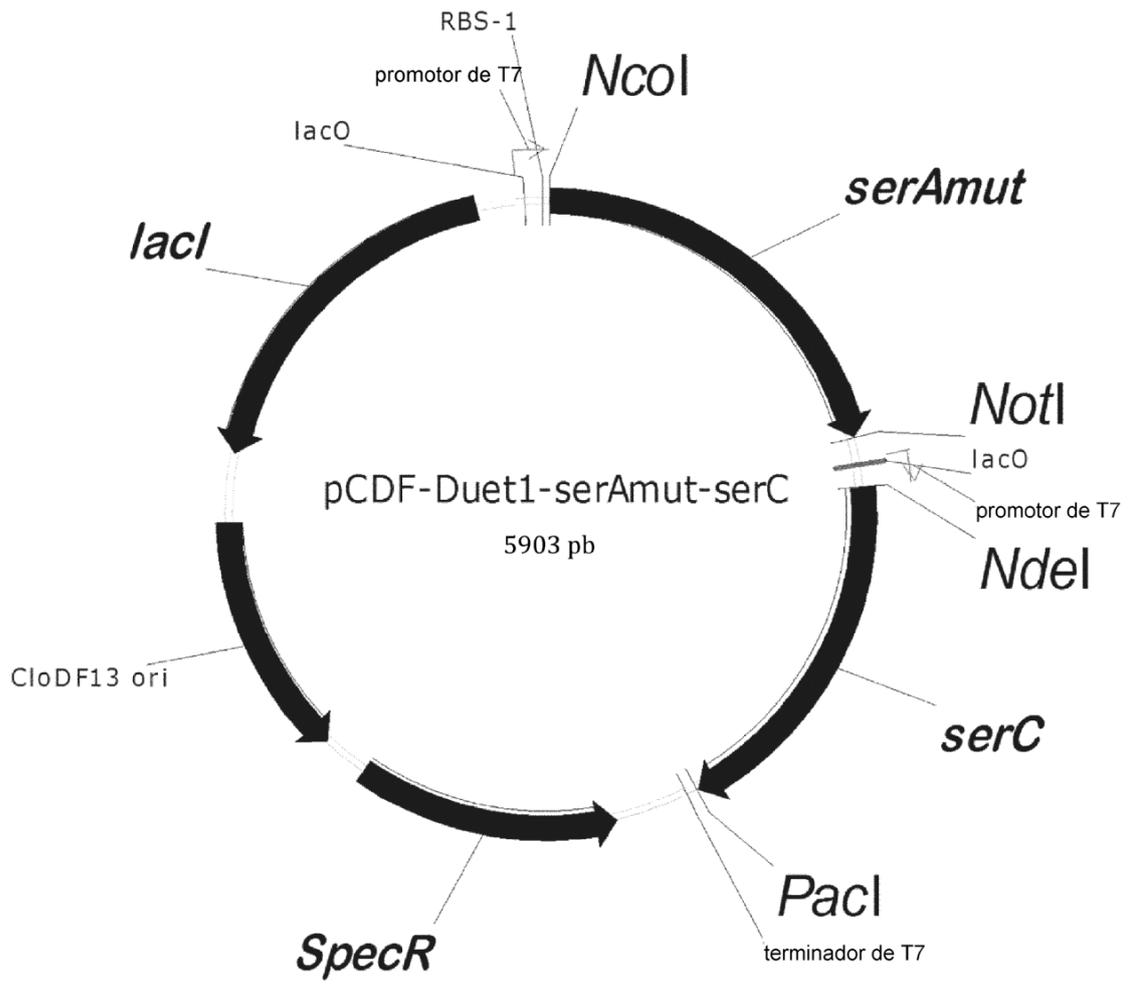


Figura 2

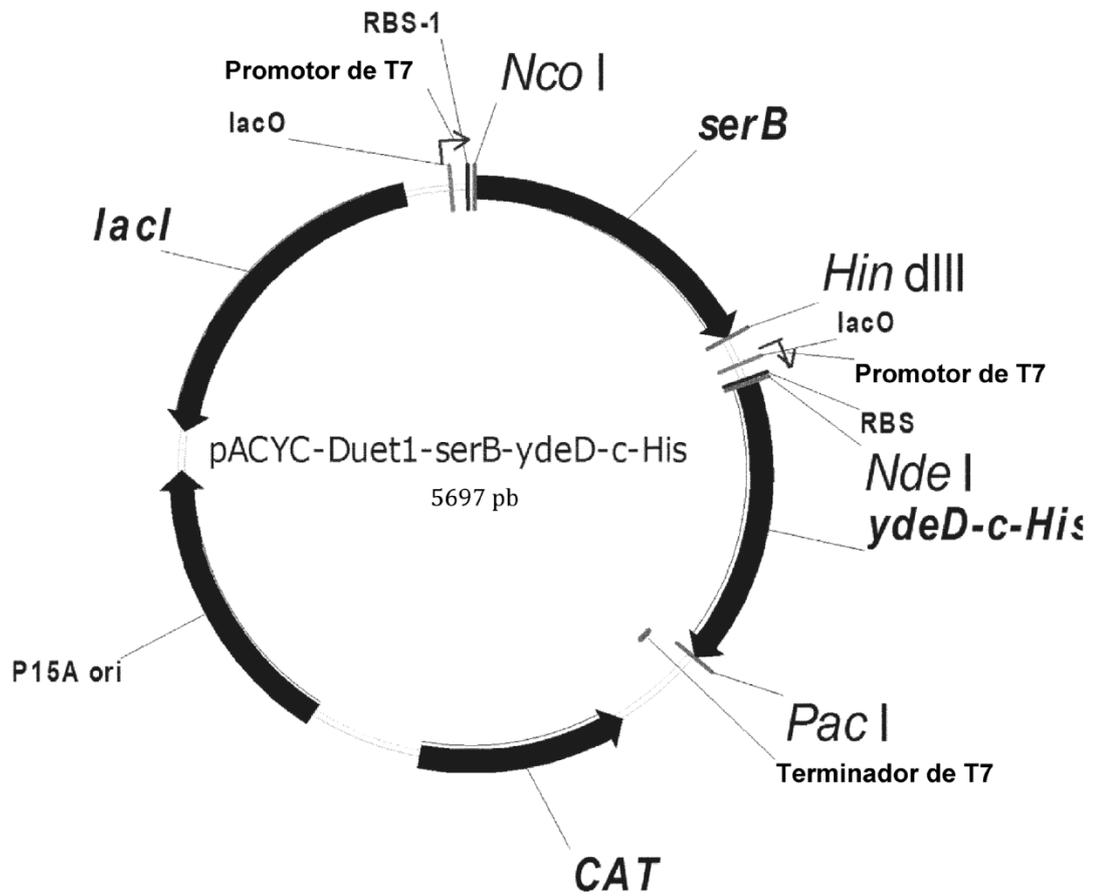


Figura 2 (cont.)

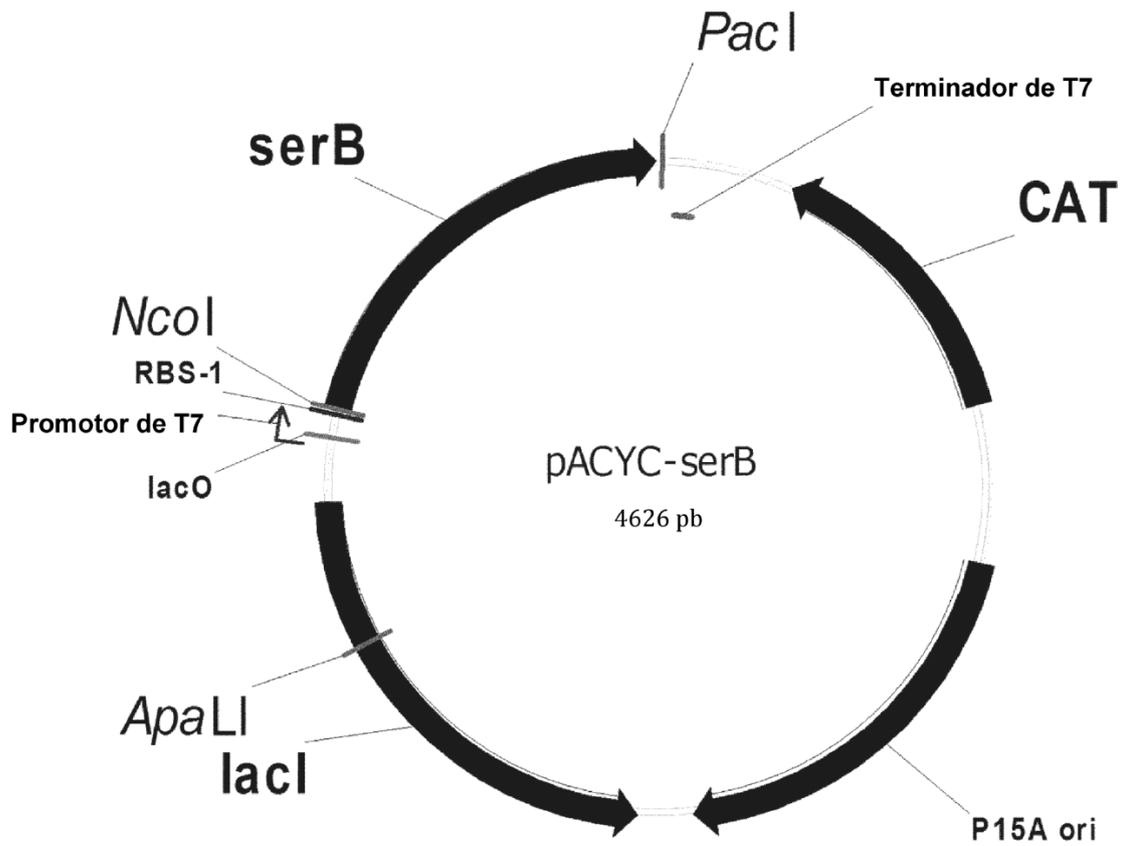


Figura 2 (cont.)

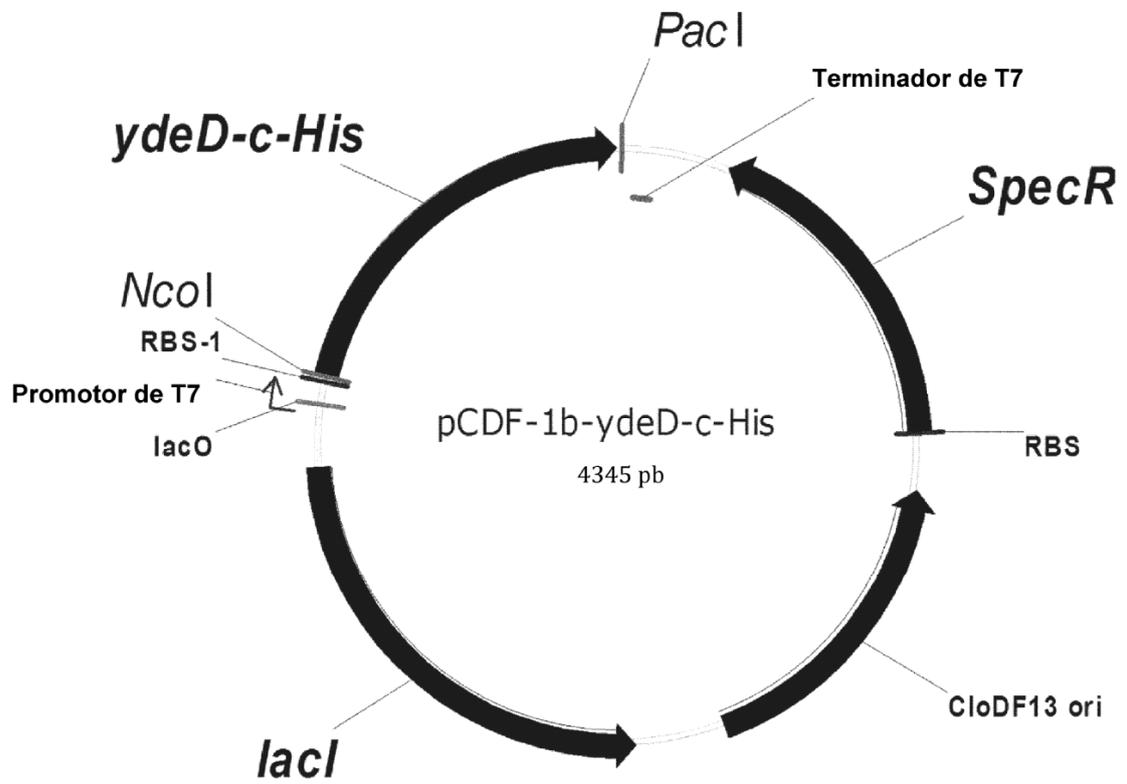


Figura 2 (cont.)

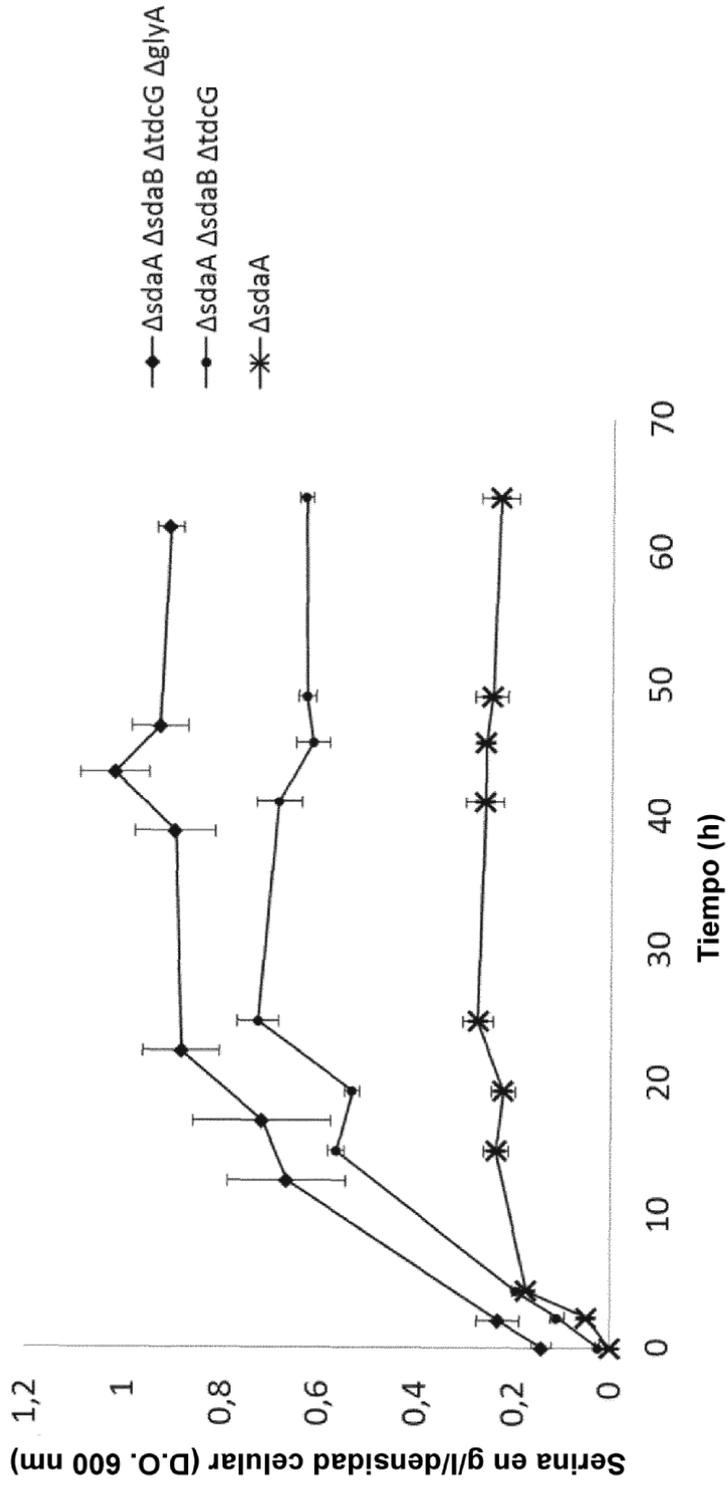


Figura 3

	Concentración de serina en g/l (+/- desviación típica)	Rend. a partir de glucosa (g de serina/g de glucosa)
$\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta tdcG \Delta glyA$ (Q1(DE3))	0,889 (+/- 0,057)	0,445
$sdaA \Delta sdaB \Delta tdcG \Delta glyA$::(DE3)	0,536 (+/- 0,019)	0,268
$\Delta sdaA$::(DE3)	0,493 (+/- 0,033)	0,247

Perfil de crecimiento con sobreexpresión del exportador ydeD en Q1(DE3)

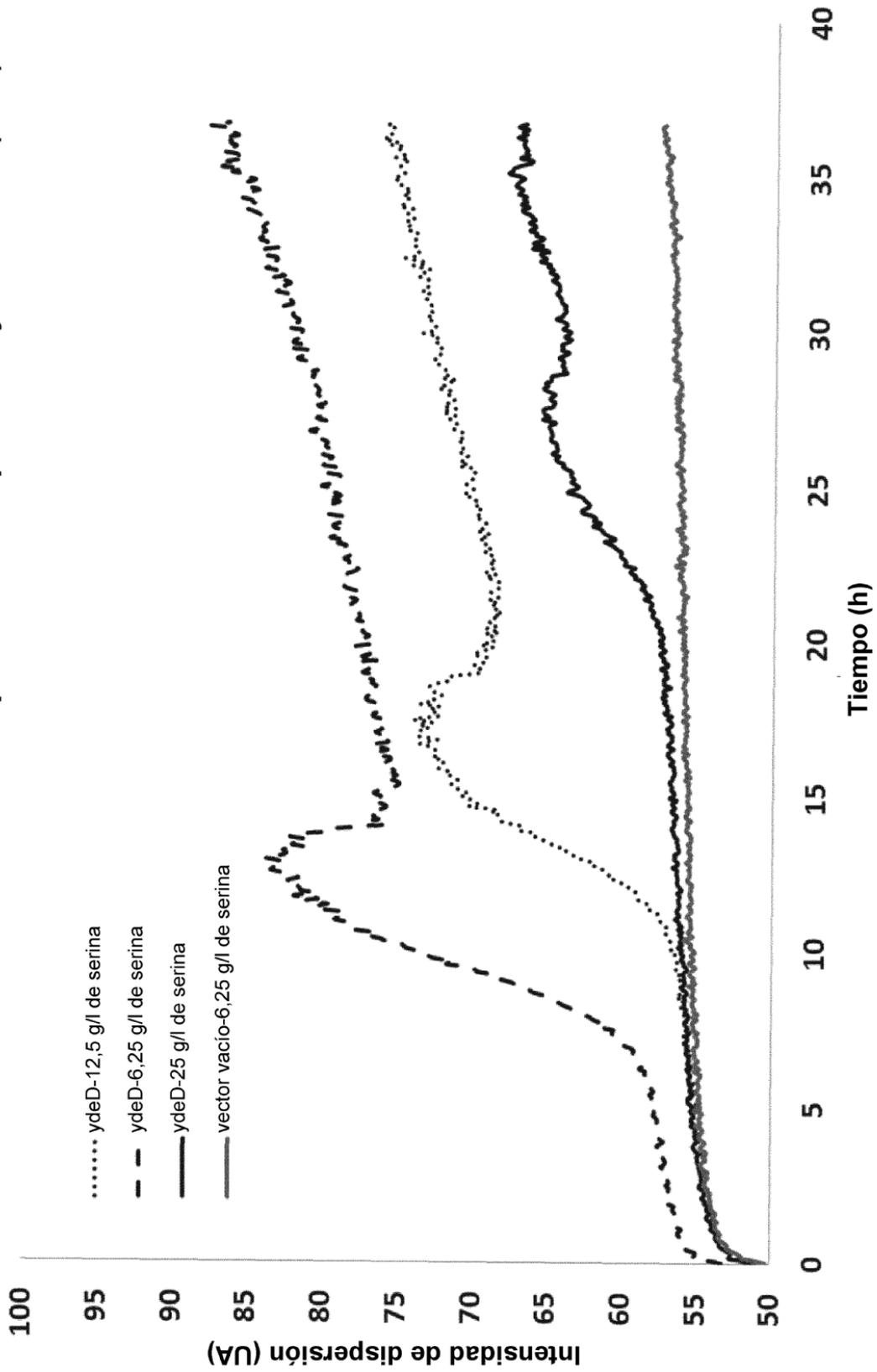


Figura 4

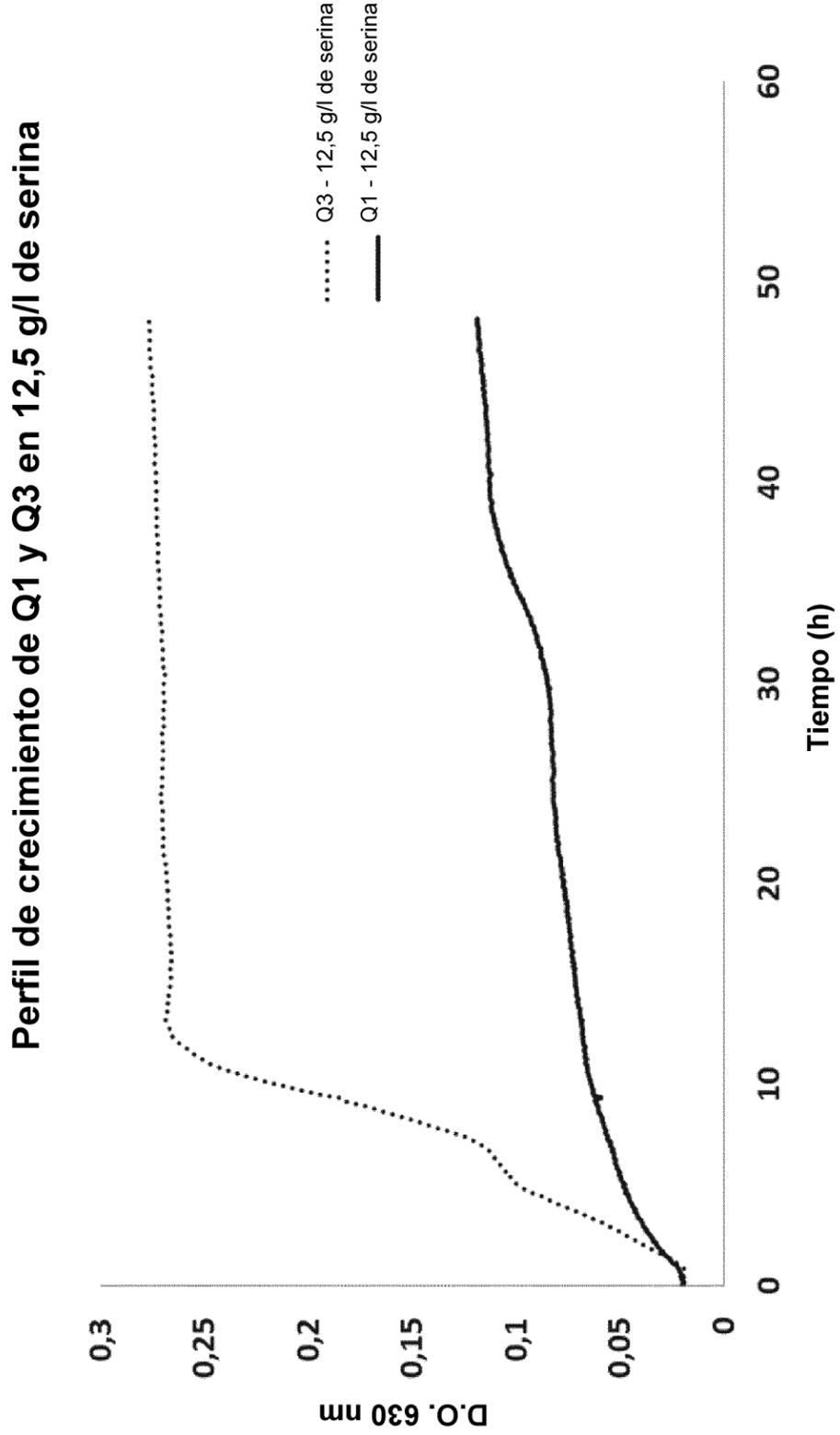


Figura 5

6A.

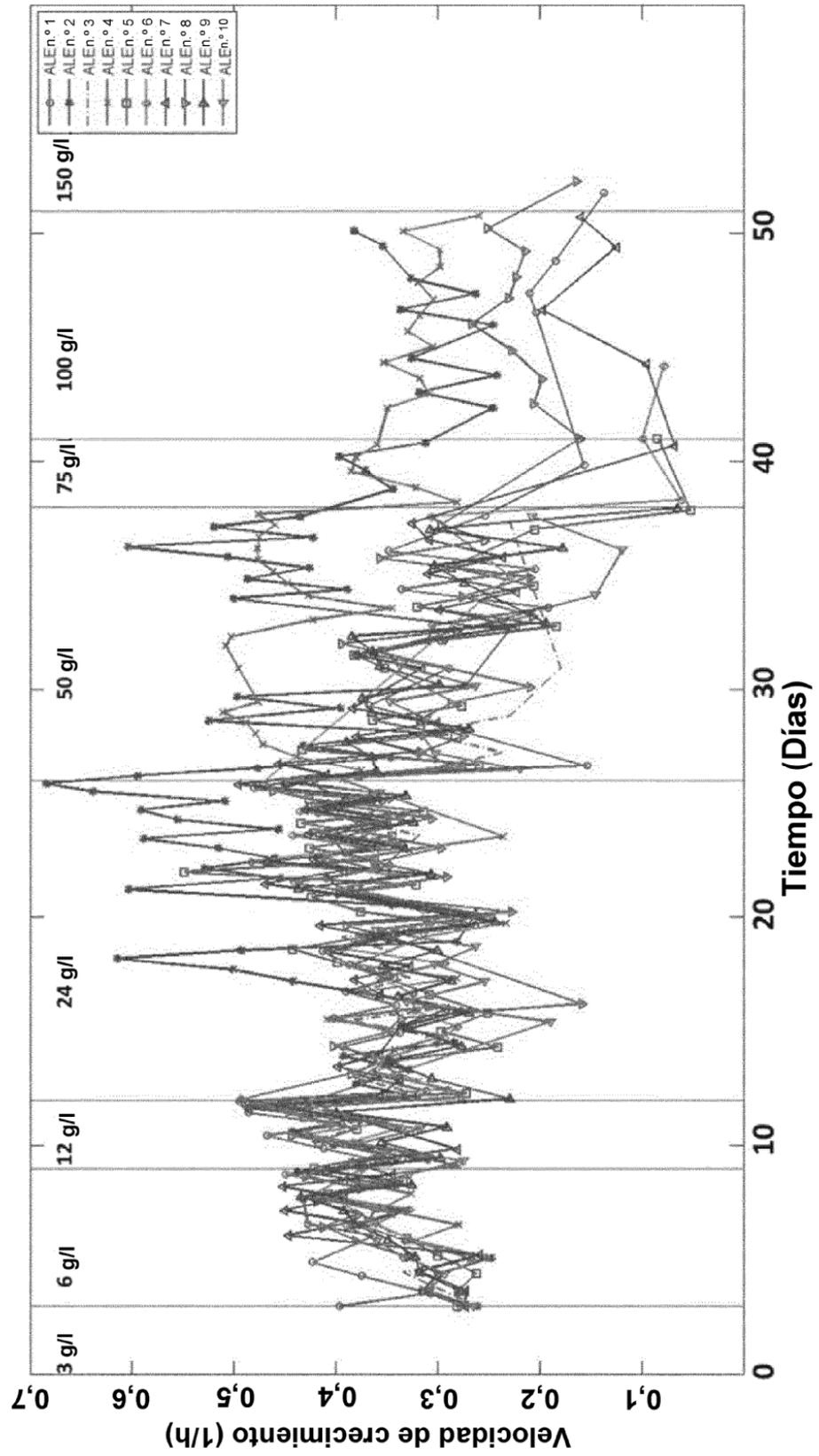


Figura 6

6B.

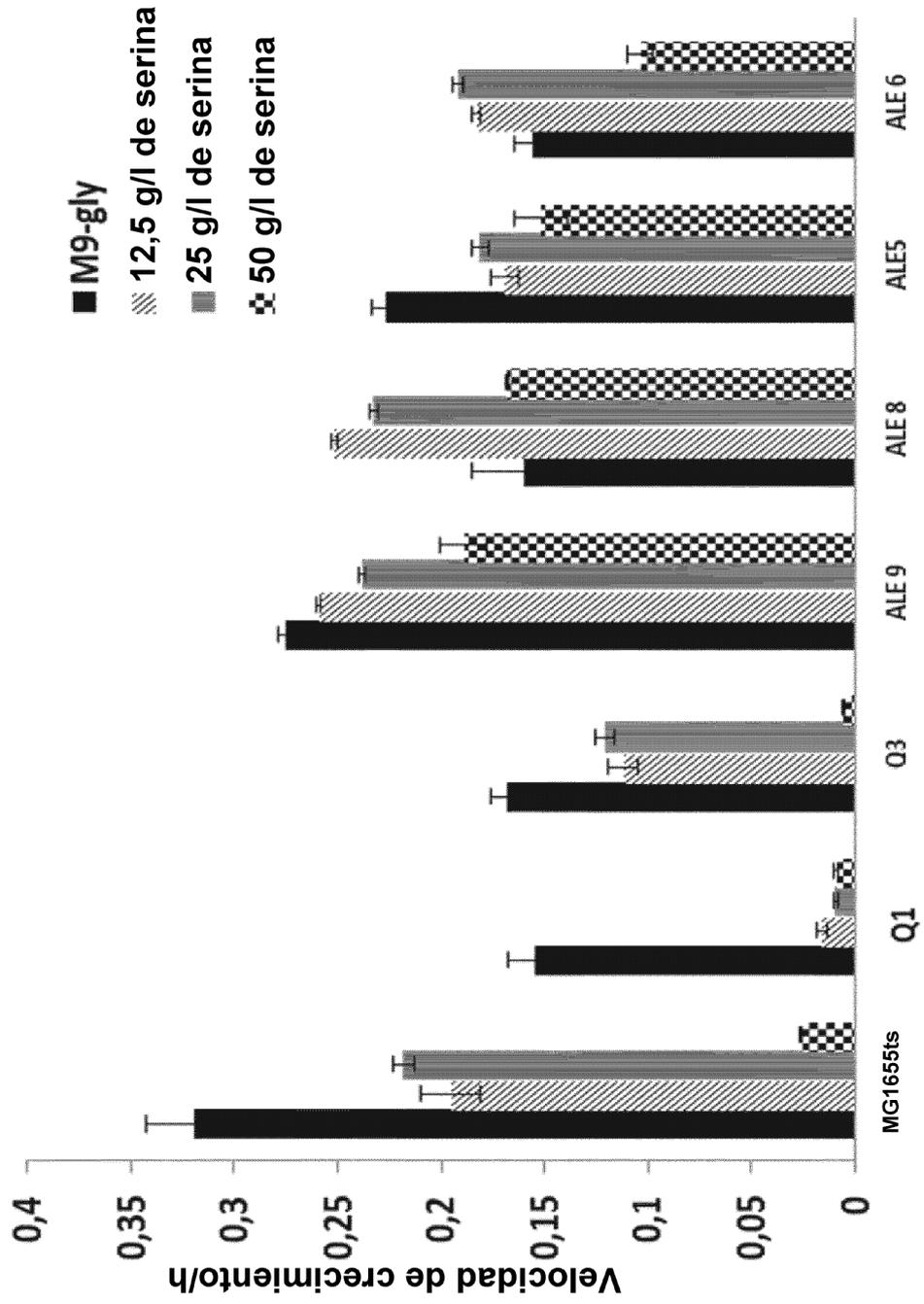


Figura 6

6C.

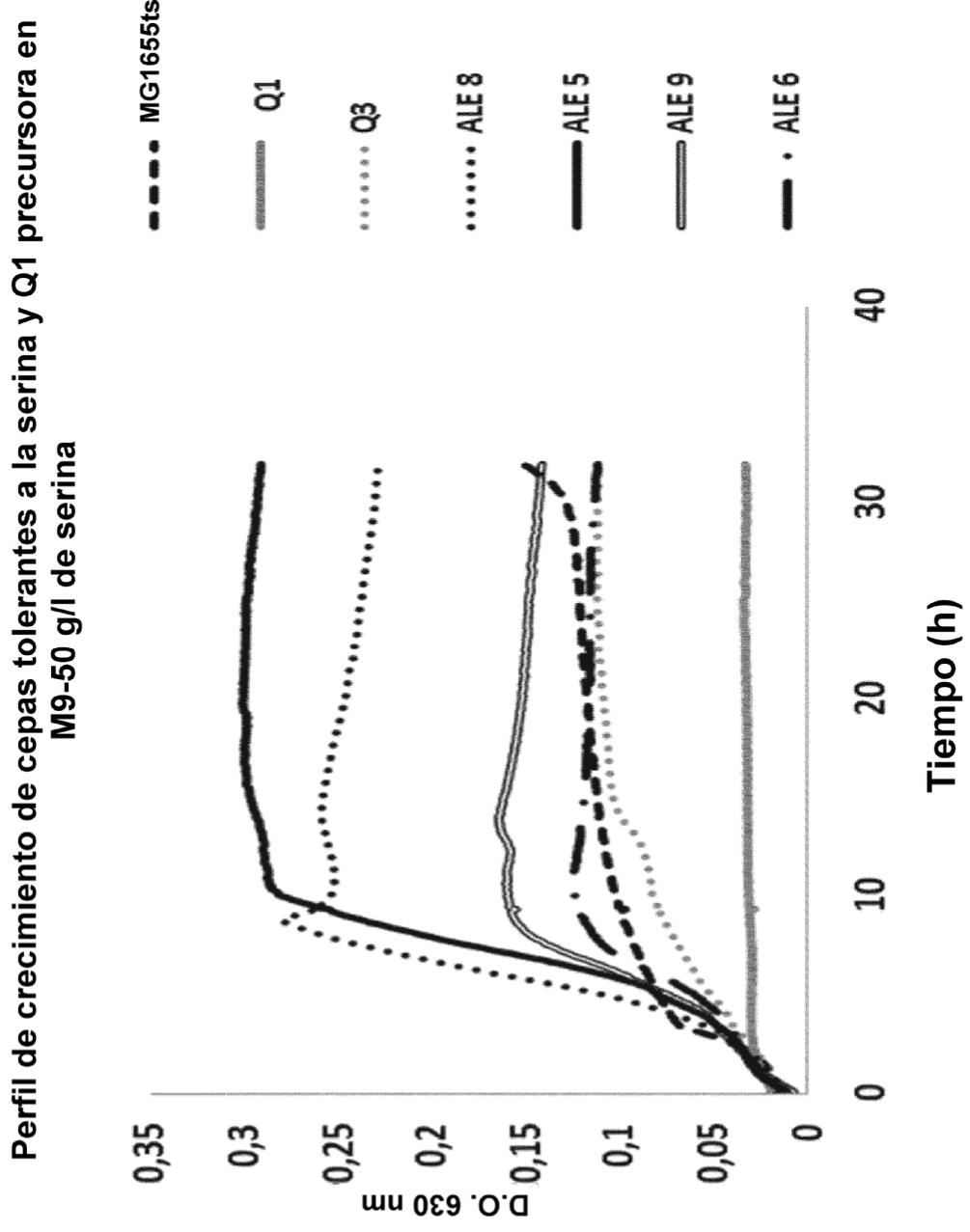


Figura 6

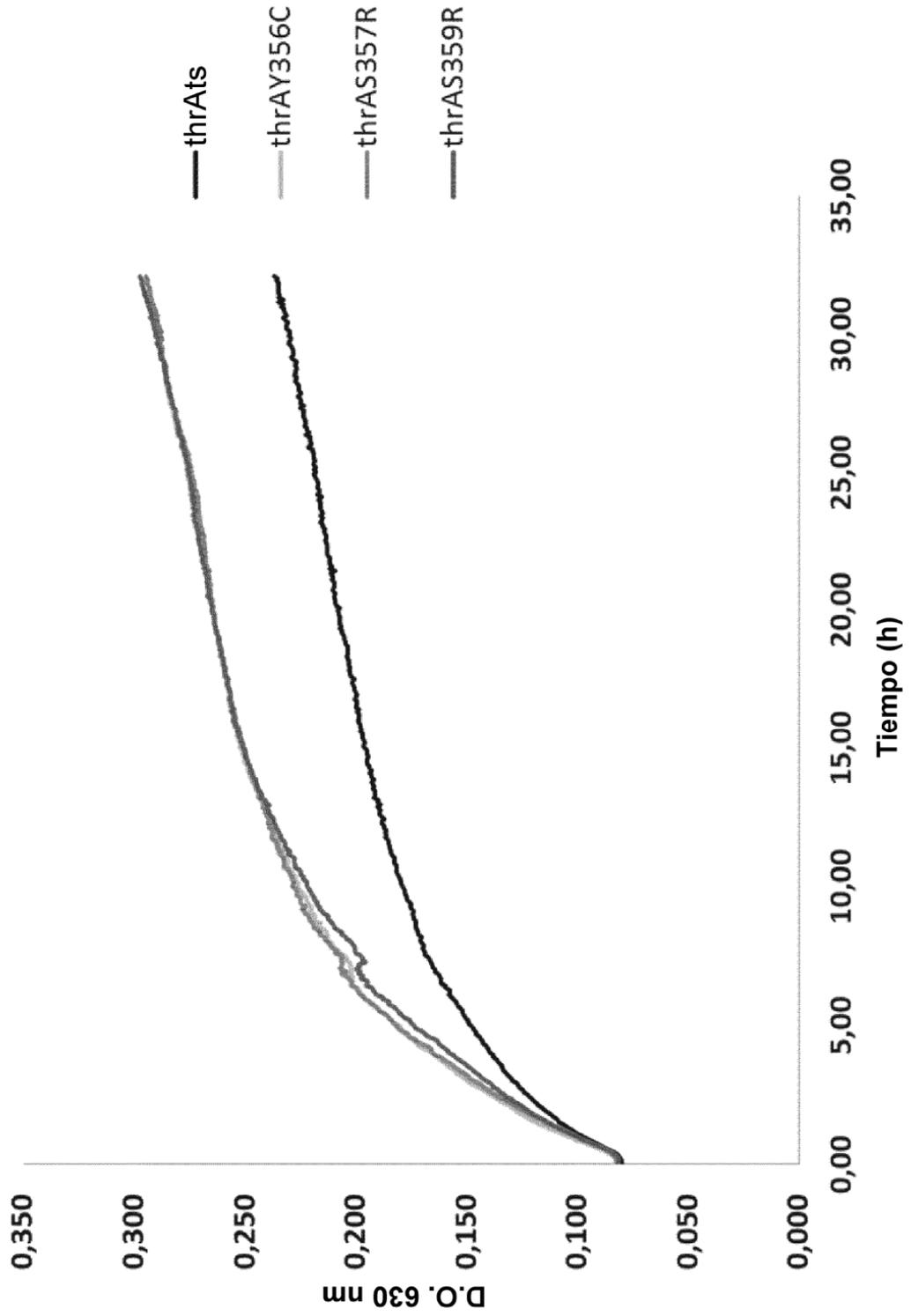


Figura 7

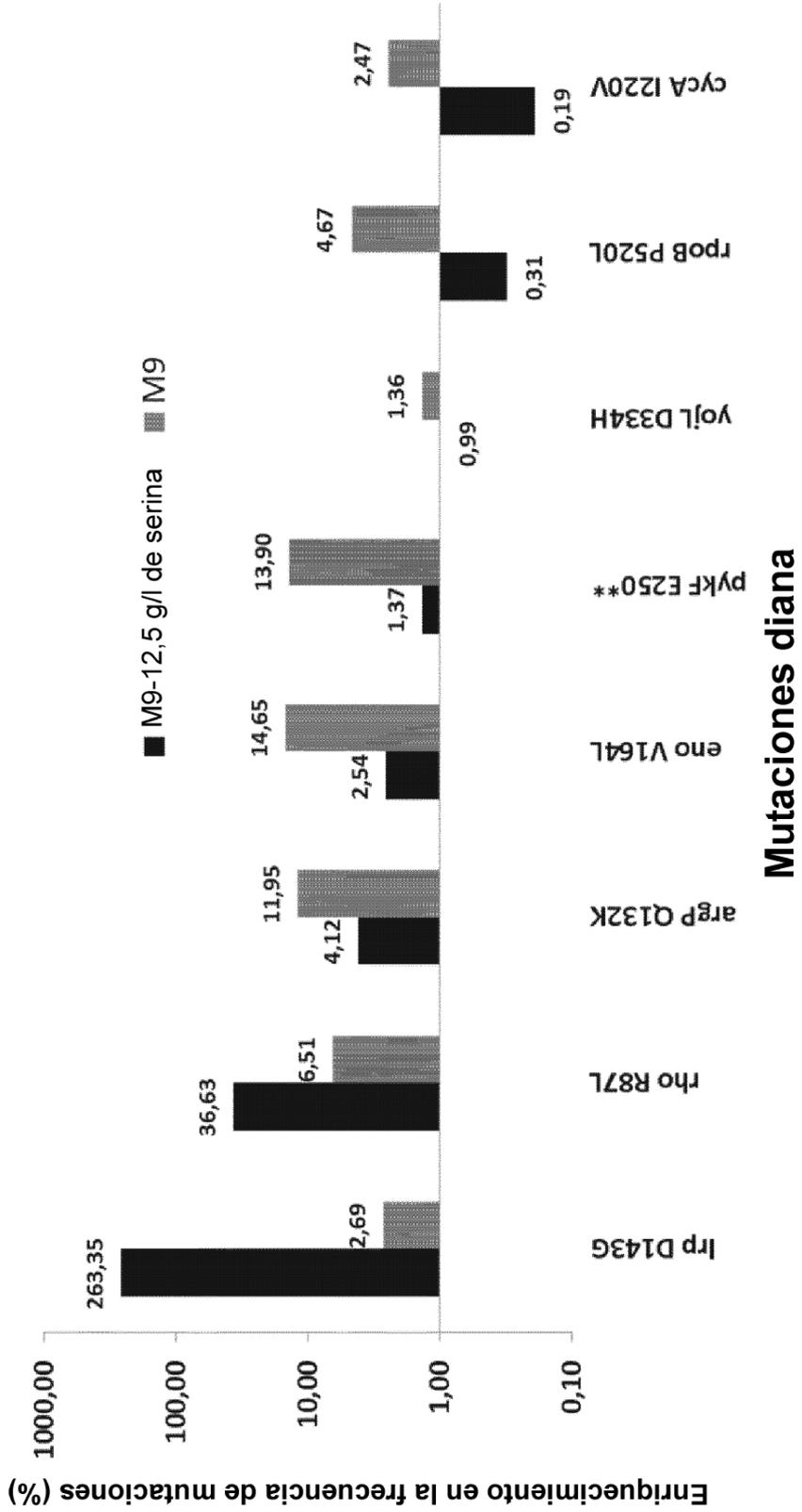


Figura 8

9A.

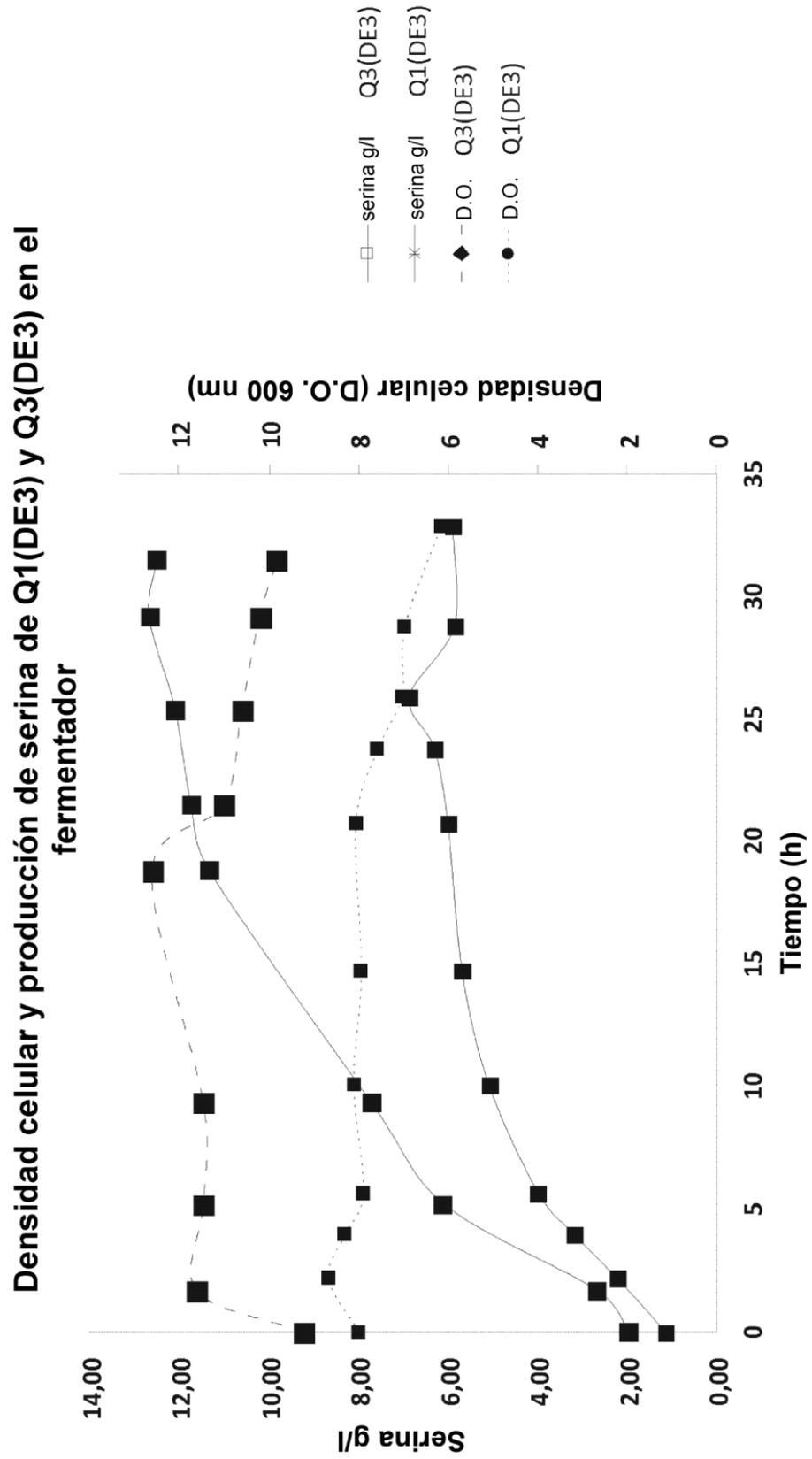
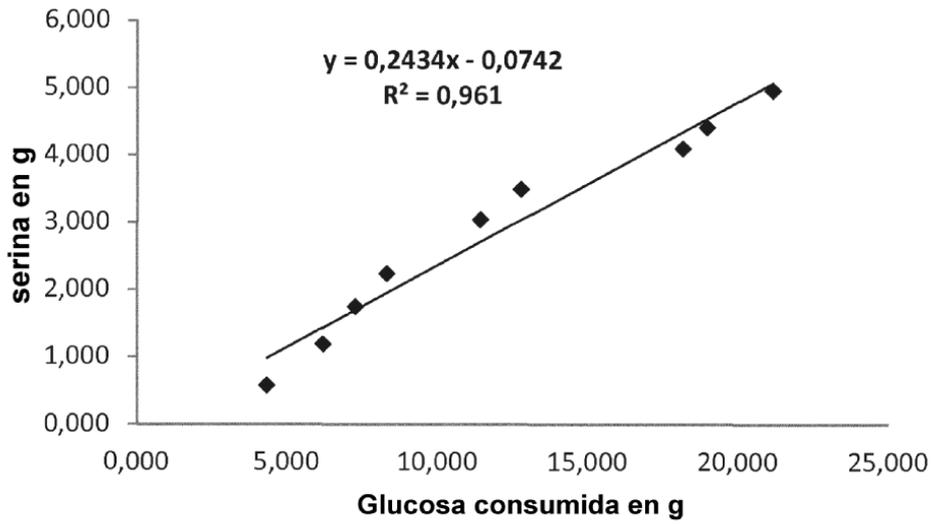


Figura 9

9B.

Eficiencia en la producción de serina de Q1(DE3)



Eficiencia en la producción de serina de Q3(DE3)

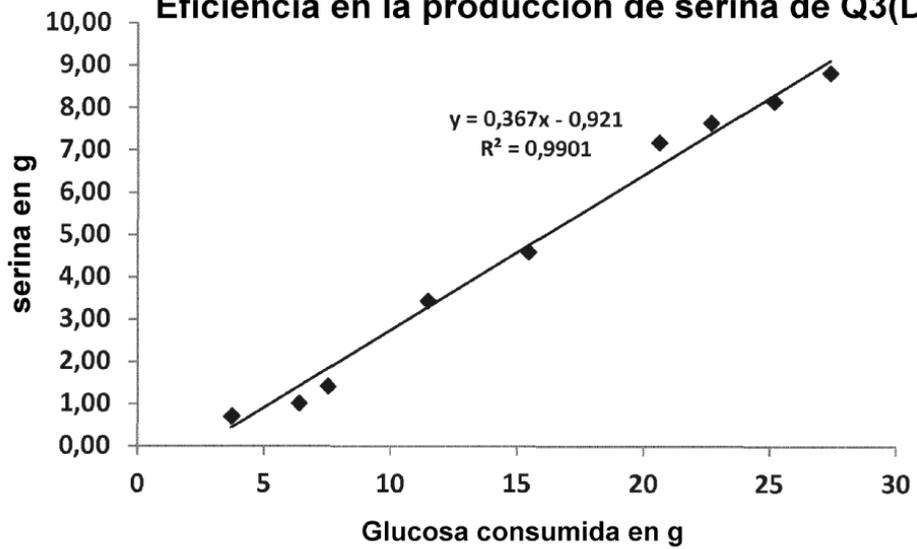
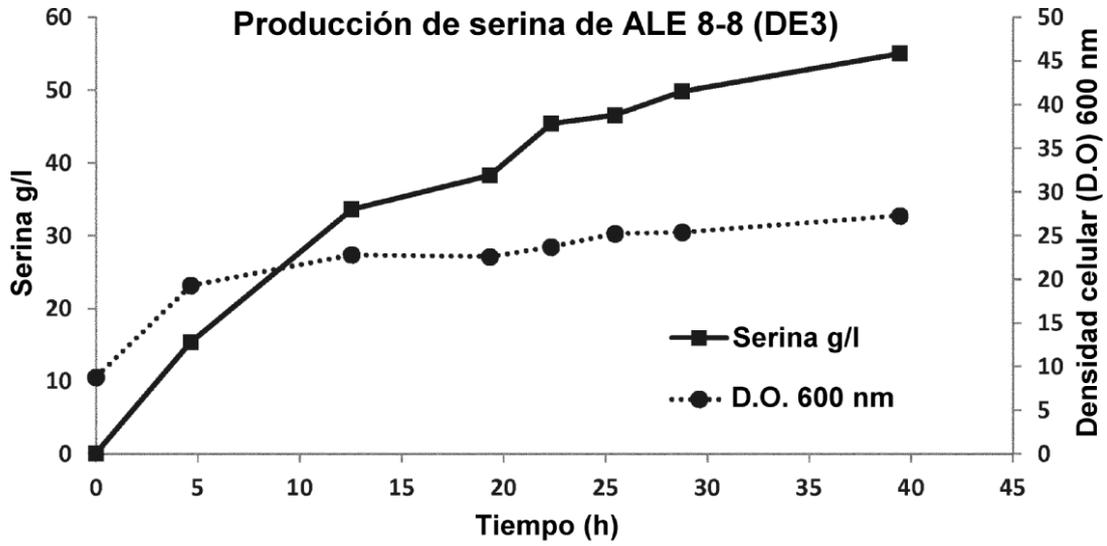


Figura 9

10A.



10B.

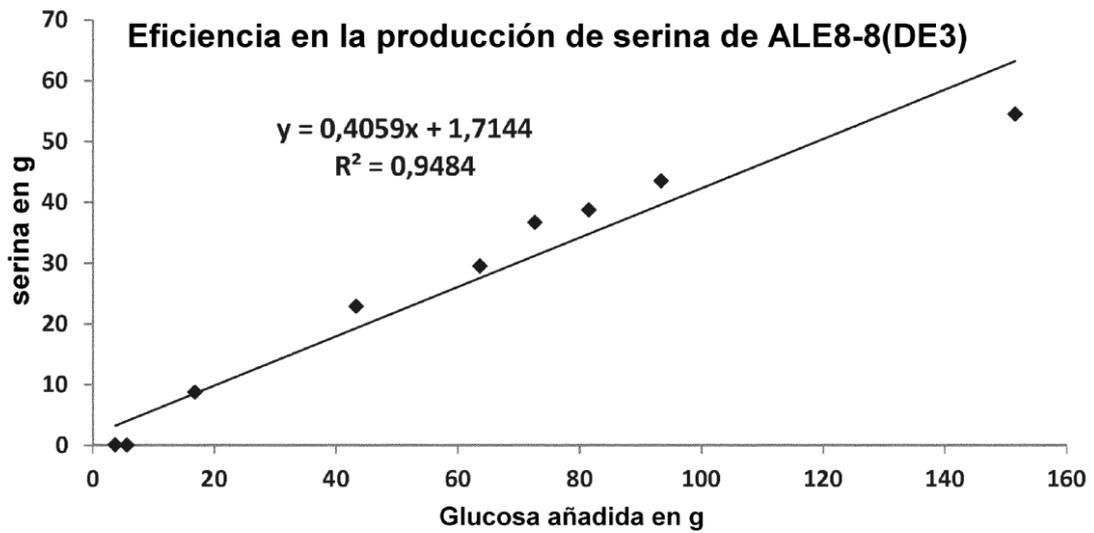
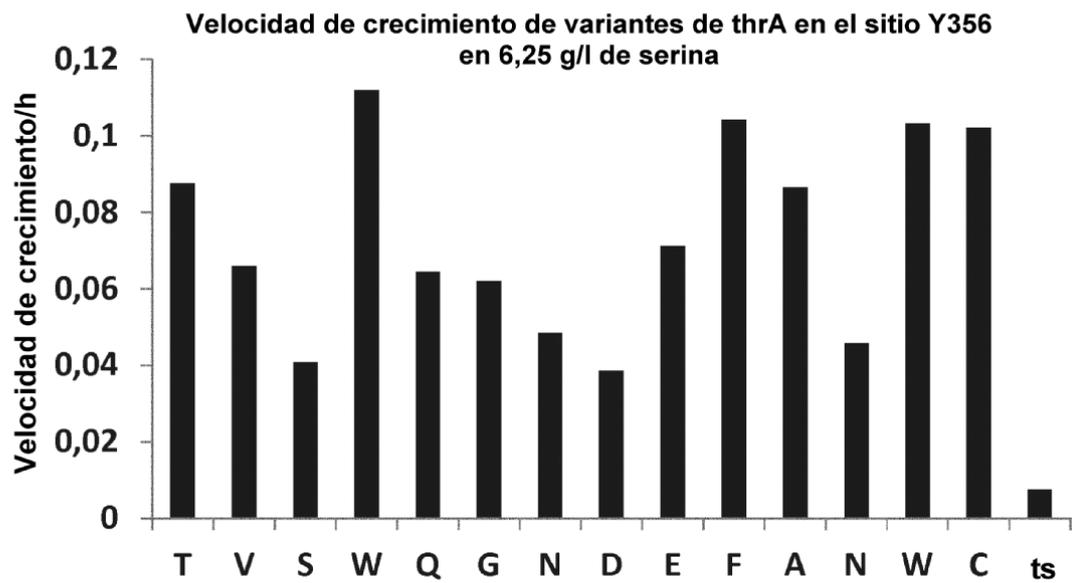


Figura 10

11A.



11B.

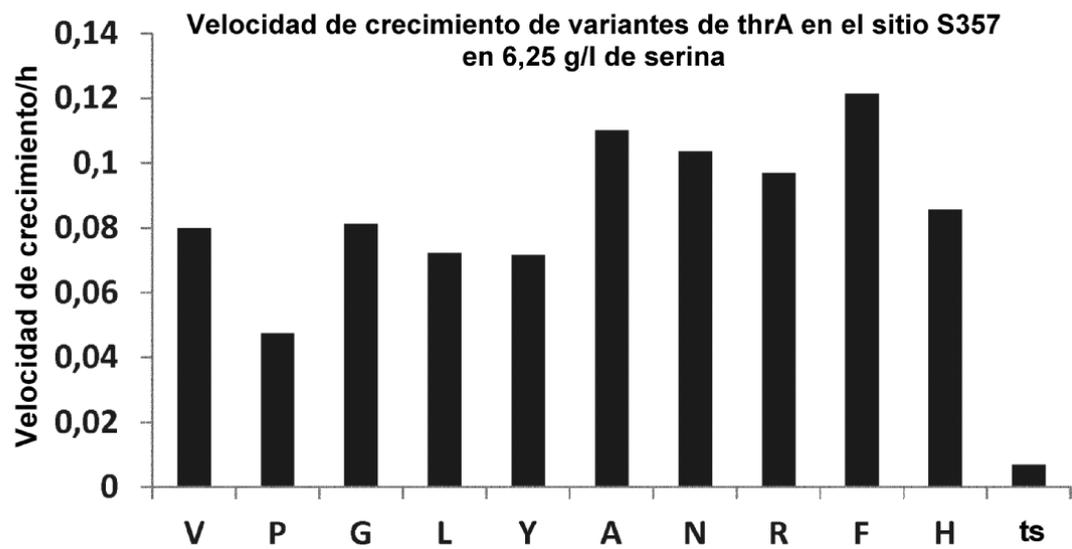


Figura 11

11C.

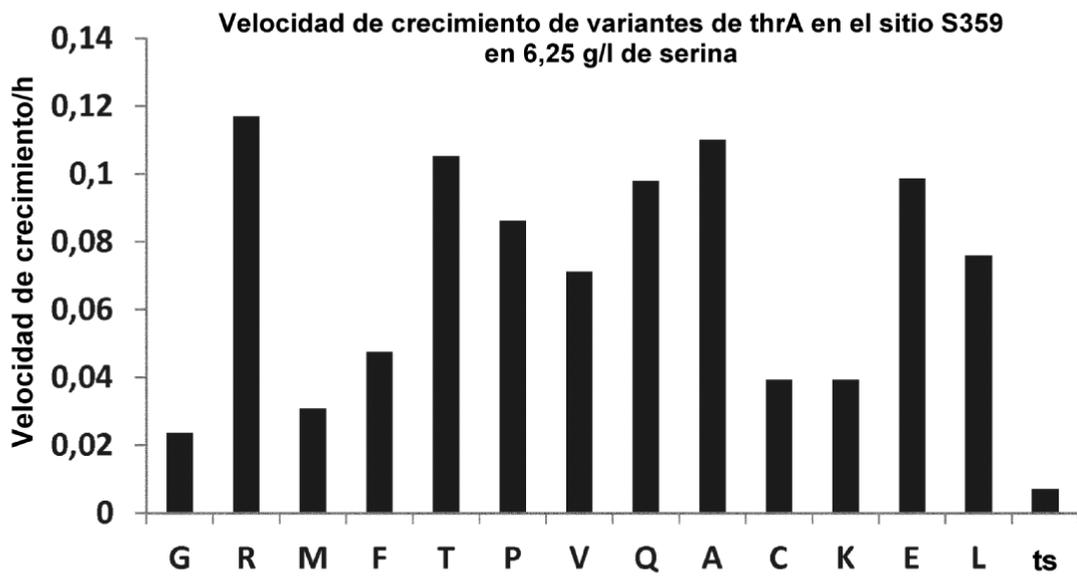


Figura 11