



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 335**

51 Int. Cl.:
C12N 9/00 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99917435 .2**
96 Fecha de presentación : **13.04.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1073722**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2001**

54 Título: **Sobreexpresión de piruvato carboxilasa para la producción aumentada de sustancias bioquímicas derivadas de oxaloacetato en células microbianas.**

30 Prioridad: **13.04.1998 US 81598 P**
23.04.1998 US 82850 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

73 Titular/es: **The University of Georgia Research Foundation, Inc.**
630 Boyd Graduate Studies Research Center
Athens, Georgia 30602-7411, US

72 Inventor/es: **Eiteman, Mark, A.;**
Gokarn, Ravi, R. y
Altman, Elliot

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 335 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

Sobreexpresión de piruvato carboxilasa para la producción aumentada de sustancias bioquímicas derivadas de oxaloacetato en células microbianas.

5

Antecedentes de la invención

Existe un tremendo potencial comercial para producir productos bioquímicos derivados de oxaloacetato vía procesos de fermentación bacteriana aerobia o anaerobia. Los procesos de fermentación aerobia se pueden usar para producir aminoácidos derivados de oxaloacetato, tales como asparagina, aspartato, metionina, treonina, isoleucina, y lisina. En particular, la lisina es de gran interés comercial en el comercio mundial. Las materias primas representan una porción significativa del coste de producción de lisina, y por tanto el rendimiento del proceso (producto generado por sustrato consumido) es una medida importante del comportamiento y viabilidad económica. La regulación metabólica restrictiva del flujo de carbono (descrito más abajo) puede limitar los rendimientos del proceso. El flujo de carbono hacia oxaloacetato (OAA) permanece constante independientemente de las perturbaciones del sistema (J. Vallino *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 633-646 (1993)). En una fermentación dada a conocer, para mantener esta rígida regulación de flujo de carbono a las bajas velocidades de crecimiento deseables para la producción de lisina, las células convirtieron menos carbono en oxaloacetato, limitando de ese modo el rendimiento de la lisina (R. Kiss *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 565-574 (1992)). Por tanto, existe una tremenda oportunidad para mejorar el proceso, evitando la regulación metabólica de flujo de carbono.

Los procesos de fermentación anaerobia se pueden usar para producir ácidos orgánicos derivados de oxaloacetato, tales como malato, fumarato y succinato. También se pueden usar procesos químicos que usan materia prima petrolífera, y han sido históricamente más eficaces para la producción de estos ácidos orgánicos que las fermentaciones bacterianas. El ácido succínico en particular, y sus derivados, tienen gran potencial para uso como productos químicos de especialidad. Se pueden emplear ventajosamente en diversas aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, y también pueden servir como materiales de partida en la producción de productos químicos tales como 1,4-butanodiol y tetrahidrofurano (L. Schilling, *FEMS Microbiol. Rev.*, 16, 101-110 (1995)). Las bacterias anaerobias de la panza de animales se han considerado para uso en la producción de ácido succínico vía procesos de fermentación bacteriana, pero estas bacterias tienden a sufrir una lisis durante la fermentación. Más recientemente, se ha usado *Anaerobiospirillum succiniciproducens* estrictamente anaerobia, que es más robusta y produce mayores niveles de succinato (R. Datta, patente U.S. 5.143.833 (1992); R. Datta *et al.*, *Eur. Sol. Pat. Eur.* 405707 (1990)).

Los procesos de fermentación comerciales usan hidratos de carbono derivados de cosechas para producir productos bioquímicos en masa. La glucosa, un sustrato de hidrato de carbono común, se metaboliza habitualmente vía la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), también conocida como la ruta glucolítica, a fosfoenolpiruvato (PEP) y después a piruvato. Todos los organismos derivan alguna energía de la ruptura glucolítica de la glucosa, independientemente de si se hacen crecer aeróbica o anaeróticamente. Sin embargo, más allá de estos dos intermedios, las rutas para el metabolismo del carbono son diferentes dependiendo de si el organismo crece aeróbica o anaeróticamente, y los destinos de PEP y piruvato dependen del organismo particular implicado, así como de las condiciones bajo las cuales está teniendo lugar el metabolismo.

En el metabolismo aerobio, los átomos de carbono de la glucosa se oxidan completamente a dióxido de carbono en un proceso cíclico conocido como el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) o, algunas veces, el ciclo del ácido cítrico, o ciclo de Krebs. El ciclo del TCA comienza cuando el oxaloacetato se combina con acetil-CoA para formar citrato. La oxidación completa de glucosa durante el ciclo del TCA libera en último lugar significativamente más energía a partir de una sola molécula de glucosa que la que se extrae durante la glucólisis sola. Además de alimentar el ciclo del TCA en fermentaciones aerobias, el oxaloacetato también sirve como un precursor importante para la síntesis de los aminoácidos asparagina, aspartato, metionina, treonina, isoleucina y lisina. Esta ruta aerobia se muestra en la Fig. 1 para *Escherichia coli*, el microorganismo más comúnmente estudiado. Los organismos anaerobios, por otra parte, no oxidan completamente la glucosa. En su lugar, se usan el piruvato y el oxaloacetato como moléculas aceptoras en la reoxidación de cofactores reducidos (NADH) generados en la ruta de EMP. Esto conduce a la generación y acumulación de productos bioquímicos reducidos tales como acetato, lactato, etanol, formiato y succinato. En la Fig. 2 se muestra esta ruta anaerobia para *E. coli*.

Los intermedios del ciclo del TCA también se usan en la biosíntesis de muchos compuestos celulares importantes. Por ejemplo, el α -cetoglutarato se usa para biosintetizar los aminoácidos glutamato, glutamina, arginina, y prolina, y la succinil-CoA se usa para biosintetizar porfirinas. En condiciones anaerobias, estos intermedios importantes todavía son necesarios. Como resultado, la succinil-CoA, por ejemplo, se obtiene en condiciones anaerobias a partir de oxaloacetato en una reacción inversa; es decir, el ciclo del TCA se lleva a cabo hacia atrás desde el oxaloacetato hasta la succinil-CoA.

El oxaloacetato que se usa para la biosíntesis de estos compuestos se debe de reponer si el ciclo del TCA va a continuar sin decaimiento y se va a mantener la funcionalidad metabólica. Muchos organismos han desarrollado así lo que se conoce como "rutas anapleróticas", que regeneran intermedios para el reclutamiento en el ciclo del TCA. Entre las reacciones importantes que logran este reabastecimiento están aquellas en las que se forma oxaloacetato a partir de PEP o piruvato. Estas rutas que resuministran intermedios al ciclo del TCA se pueden utilizar durante el metabolismo aerobio o anaerobio.

PEP ocupa una posición central, o nodo, en el metabolismo de hidratos de carbono. Como el intermedio final en la glucólisis, y por tanto el precursor inmediato en la formación de piruvato vía la acción de la enzima piruvato cina-
 5 nasa, puede servir como una fuente de energía. Adicionalmente, PEP puede reponer intermedios en el ciclo del TCA vía la acción anaplerótica de la enzima PEP carboxilasa, que convierte PEP directamente en el intermedio de TCA
 10 oxaloacetato. A menudo, PEP es también un cosustrato para la captación de glucosa en la célula vía el sistema de fosfotransferasa (PTS), y se usa para biosintetizar aminoácidos aromáticos. En muchos organismos, los intermedios del ciclo del TCA se pueden regenerar directamente a partir de piruvato. Por ejemplo, la piruvato carboxilasa (PYC), que se encuentra en algunas bacterias pero no en *E. coli*, media la formación de oxaloacetato mediante la carboxilación de piruvato utilizando carboxibiotina. Como se puede esperar, el reparto de PEP está regulado rígidamente por
 15 mecanismos de control celulares, provocando un “cuello de botella” metabólico que limita la cantidad y dirección de carbono que fluye a través de esta coyuntura. En la Fig. 3 se muestran las conversiones, mediadas por enzimas, que se producen entre PEP, piruvato y oxaloacetato.

Los intermedios del ciclo del TCA también se pueden regenerar en algunas plantas y microorganismos a partir de
 15 acetil-CoA vía lo que se conoce como la “derivación del glioxilato”, “bypass de glioxilato” o ciclo de glioxilato (Fig. 4). Esta ruta permite crecer a los organismos sobre sustratos de 2 carbonos, para reponer su oxaloacetato. Los ejemplos de sustratos de 2 carbonos incluyen acetato y otros ácidos grasos, así como n-alcenos de cadena larga. Estos sustratos no proporcionan ningún intermedio de 3 carbonos tal como PEP, que se puede carboxilar para formar oxaloacetato. En la derivación del glioxilato, el isocitrato procedente del ciclo del TCA se escinde en glioxilato y succinato mediante la
 20 enzima isocitrato liasa. El glioxilato liberado se combina con acetil-CoA para formar malato mediante la acción de la enzima malato sintetasa. Tanto succinato como malato generan oxaloacetato mediante el ciclo del TCA. La expresión de los genes que codifican las enzimas del bypass del glioxilato está fuertemente controlada, y normalmente estos genes son reprimidos cuando están disponibles compuestos de 3 carbonos. Por ejemplo, en *E. coli*, los genes que codifican las enzimas del bypass del glioxilato están localizados en el operón aceBAK y están controlados por varios
 25 reguladores transcripcionales: *iclR* (A. Sunnarborg *et al.*, J. Bacteriol., 163, 2642-2649 (1990)), *fadR* (W. Nunn *et al.*, J. Bacteriol., 148, 83-90 (1981)), *fruR* (A. Chia *et al.*, J. Bacteriol., 171, 2424-2434 (1989)), y *arcAB* (S. Iuchi *et al.*, J. Bacteriol., 171, 868-873 (1989)); S. Iuchi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1888-1892 (1988)). Las enzimas del bypass del glioxilato no son expresadas cuando *E. coli* se hace crecer sobre glucosa, glicerol, o piruvato como fuente de carbono. La derivación del glioxilato es inducida por ácidos grasos tales como acetato (Kornberg, Biochem. J., 99,
 30 1-11 (1966)).

Se han llevado a cabo diversas estrategias de ingeniería metabólica, con poco éxito, en un esfuerzo para evitar la rigidez de la red que rodea al metabolismo del carbono. Por ejemplo, se ha mostrado que la sobreexpresión de la enzima
 35 natural PEP carboxilasa en *E. coli* incrementa el flujo de carbono hacia oxaloacetato (C. Millard *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 62, 1808-1810 (1996); W. Farmer *et al.*, Appl. Env. Microbiol., 63, 3205-3210(1997)); sin embargo, tales manipulaciones genéticas también provocan una disminución de la captación de glucosa (P. Chao *et al.*, Appl. Env. Microbiol., 59, 4261-4265 (1993)), puesto que PEP es un cosustrato requerido para el transporte de la glucosa vía el sistema de fosfotransferasa. Igualmente, un intento para mejorar la biosíntesis de la lisina en *Corynebacterium glutamicum* sobreexpresando PEP carboxilasa no tuvo éxito (J. Cremer *et al.*, Appl. Env. Microbiol., 57, 1746-1752
 40 (1991)). En otro enfoque para desviar el flujo de carbono hacia oxaloacetato, la derivación del glioxilato en *E. coli* se desreprimió apagando uno de los reguladores transcripcionales, *fadR*. Sólo se observó un ligero incremento en los productos bioquímicos derivados de oxaloacetato (W. Farmer *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 63, 3205-3210 (1997)). En un enfoque diferente, la enzima málica procedente de *Ascaris suum* se sobreprodujo en *E. coli* mutante que fue deficiente para las enzimas que convierten piruvato en lactato, acetil-CoA, y formiato. Esto provocó que el piruvato
 45 se convirtiese en malato, lo que incrementó la producción de succinato (véase la Fig. 2). Sin embargo, este enfoque es problemático, puesto que la cepa mutante en cuestión no puede crecer bajo las condiciones anaerobias estrictas que se requieren para la fermentación óptima de la glucosa para dar ácidos orgánicos (L. Stols *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol., 63-65, 153-158 (1997)).

50 Un enfoque de ingeniería metabólica que salve con éxito la rigidez de la red que caracteriza al metabolismo del carbono y desvíe más carbono hacia oxaloacetato, incrementando de ese modo los rendimientos de productos bioquímicos derivados de oxaloacetato por cantidad de glucosa añadida, representaría un avance significativo y largo tiempo esperado en el campo.

55 El documento WO 99/18228 describe un método para la producción microbiana de aminoácidos de la familia aspartato y/o glutamato, en el que la actividad de piruvato carboxilasa se incrementa cambiando genéticamente la enzima y/o la expresión génica de piruvato carboxilasa de un microorganismo que produce el aminoácido correspondiente.

Sumario de la invención

60 La presente invención emplea un enfoque de ingeniería metabólica único que evita una limitación metabólica que las células usan para regular la síntesis del producto bioquímico oxaloacetato. La invención utiliza ingeniería metabólica para desviar más carbono desde piruvato hacia oxaloacetato haciendo uso de la enzima piruvato carboxilasa. Esta hazaña se puede lograr introduciendo un fragmento de ácido nucleico natural (es decir, endógeno) y/o extraño
 65 (es decir, heterólogo) que codifica una piruvato carboxilasa en una célula hospedante, de forma que una piruvato carboxilasa funcional se sobreproduce en la célula. Como alternativa, el ADN de una célula que expresa endógenamente una piruvato carboxilasa se puede mutar para alterar la transcripción del gen de piruvato carboxilasa natural para provocar la sobreproducción de la enzima natural. Por ejemplo, se puede obtener un cromosoma mutado empleando

mutagénesis química o transposónica, y después identificando mutantes con actividad potenciada de piruvato carboxilasa usando métodos que son bien conocidos en la técnica. La sobreexpresión de piruvato carboxilasa provoca que el flujo de carbono se desvíe preferentemente hacia oxaloacetato, y de este modo incrementa la producción de productos bioquímicos que son biosintetizados a partir de oxaloacetato como precursor metabólico.

5 En consecuencia, la presente invención proporciona una célula metabólicamente manipulada mediante ingeniería para la producción potenciada de productos bioquímicos derivados de oxaloacetato, en la que dicha célula expresa una piruvato carboxilasa, en la que una célula de tipo natural comparable carece de una piruvato carboxilasa endógena, con la condición de que dicha célula metabólicamente manipulada mediante ingeniería no sea una célula de *Escherichia coli* con una producción potenciada de un aminoácido de la familia del aspartato. La sobreexpresión de piruvato carboxilasa se efectúa preferiblemente transformando la célula con un fragmento de ADN que codifica una piruvato carboxilasa que deriva de un organismo que expresa endógenamente piruvato carboxilasa, tal como *Rhizobium etli* o *Pseudomonas fluorescens*. Opcionalmente, la célula metabólicamente manipulada mediante ingeniería de la invención sobreexpresa PEP carboxilasa, además de piruvato carboxilasa. También opcionalmente, la célula metabólicamente manipulada mediante ingeniería no expresa un nivel detectable de PEP carboxilasa. En una realización particularmente preferida de la invención, la célula metabólicamente manipulada mediante ingeniería es una célula de *C. glutamicum*, *E. coli*, *Brevibacterium flavum*, o *Brevibacterium lactofermentum* que expresa una piruvato carboxilasa heteróloga.

20 La invención también incluye un método para obtener una célula metabólicamente manipulada por ingeniería, que implica transformar una célula con un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que tiene actividad de piruvato carboxilasa, para producir una célula metabólicamente manipulada mediante ingeniería que sobreexpresa piruvato carboxilasa. El método incluye opcionalmente cotransformar la célula con un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que tiene actividad de PEP carboxilasa, de forma que las células metabólicamente manipuladas mediante ingeniería también sobreexpresan PEP carboxilasa.

30 También se incluye en la invención un método para obtener un producto bioquímico derivado de oxaloacetato, que incluye proporcionar una célula que produce el producto bioquímico; transformar la célula con un fragmento de ácido nucleico que contiene una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que tiene actividad de piruvato carboxilasa; en el que una célula de tipo natural que es comparable a dicha célula antes de la transformación carece de una piruvato carboxilasa endógena que expresa la enzima en la célula para provocar un aumento de producción del producto bioquímico; y aislar el producto bioquímico de la célula. Los productos bioquímicos preferidos que tienen oxaloacetato como precursor metabólico incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos tales como lisina, asparagina, aspartato, metionina, treonina, e isoleucina; ácidos orgánicos tales como succinato, malato y fumarato; nucleótidos de pirimidina; y porfirinas.

40 La invención describe además un fragmento de ácido nucleico aislado de *P. fluorescens*, que contiene una secuencia nucleotídica que codifica una enzima piruvato carboxilasa, preferiblemente la enzima piruvato carboxilasa $\alpha 4\beta 4$ producida por *P. fluorescens*.

Breve descripción de los dibujos

45 Figura 1. Ruta aerobia en *E. coli* que representa la glucólisis, el ciclo del TCA, y la biosíntesis de productos bioquímicos derivados de oxaloacetato; las líneas discontinuas significan que se requieren múltiples etapas para biosintetizar el compuesto, mientras que las líneas continuas significan una conversión de una etapa; la participación de PEP en la captación de glucosa es mostrada mediante una línea tenue; la ruta como se muestra no es estequiométrica, ni incluye cofactores.

50 Figura 2. Ruta anaerobia en *E. coli* que representa la glucólisis y biosíntesis de productos bioquímicos seleccionados derivados de oxaloacetato; la participación de PEP en la captación de glucosa se muestra mediante la línea discontinua. Se muestra mediante la línea discontinua; la ruta, tal como se muestra, no es estequiométrica, ni incluye todos los cofactores.

55 Figura 3. Rutas biosintéticas que regulan directamente los niveles intracelulares de oxaloacetato; no todos los organismos contienen todas estas enzimas; *E. coli*, por ejemplo, no contiene piruvato carboxilasa.

60 Figura 4. Ciclo del TCA, que muestra la entrada en el ciclo de intermedios de 3 carbonos, y que incluye también la derivación del glioxilato para intermedios de 2 carbonos (flechas más oscuras).

Figura 5. Análisis cinético de actividades de piruvato carboxilasa para MG1655 pUC18 (○) y MG1655 pUC18-*pyc* (●) con respecto a piruvato.

65 Figura 6. Efectos de concentraciones crecientes de aspartato sobre la actividad de piruvato carboxilasa.

Figura 7. Análisis cinético de piruvato carboxilasa con respecto a ATP y ADP; la actividad de piruvato carboxilasa se determinó en ausencia de ADP (●) y en presencia de 1,5 mM de ADP (○).

Figura 8. Crecimiento de una cepa de *E. coli* sin *ppc* que contiene pUC18 o el constructo pUC18-*pyc* en medio mínimo que utiliza glucosa como una única fuente de carbono.

Figura 9. Efecto de nucleótidos nicotinamídicos sobre la actividad de piruvato carboxilasa: NADH (○), NAD⁺ (□), NADPH (Δ) y NADP⁺ (◇).

Figura 10. Patrón de crecimiento y productos seleccionados de la fermentación de cepa de tipo natural (MG1655) en condiciones anaerobias estrictas en un medio de glucosa limitada (10 g/l); se midieron las concentraciones de glucosa (●), succinato (■), lactato (○), formiato (□) y la masa de las células secas (Δ).

Figura 11. Patrón de crecimiento y productos seleccionados de la fermentación de cepa de tipo natural con el vector de clonación/expresión de pUC18 (MG1655/pUC18) en condiciones anaerobias estrictas en un medio de glucosa limitada (10 g/l); se midieron las concentraciones de glucosa (●), succinato (■), lactato (○), formiato (□) y la masa de las células secas (Δ).

Figura 12. Patrón de crecimiento y productos seleccionados de la fermentación de cepa de tipo natural con el gen (MG1655/pUC18-*pyc*) en condiciones anaerobias estrictas en un medio de glucosa limitada (10 g/l); se midieron las concentraciones de glucosa (●), succinato (■), lactato (○), formiato (□) y la masa de las células secas (Δ).

Figura 13. Patrón de crecimiento y producción de treonina en la cepa β IM-4 productora de treonina (ATCC 21277) que contiene pTrc99A o pTrc99A-*pyc* en condiciones aerobias estrictas en un medio de glucosa limitada (30 g/l). Se midieron la densidad óptica en la cepa que contiene pTrc99A (○), la densidad óptica en la cepa que contiene pTrc99A-*pyc* (□), las concentraciones de treonina en la cepa que contiene pTrc99A (●), y las concentraciones de treonina en la cepa que contiene pTrc99A-*pyc* (■).

25 Descripción detallada de la invención

La manipulación metabólica mediante ingeniería implica sobreexpresar genéticamente enzimas particulares en puntos críticos en una ruta metabólica, y/o bloquear la síntesis de otras enzimas, para salvar o evitar “cuellos de botella” metabólicos. El objetivo de la manipulación metabólica mediante ingeniería es optimizar la velocidad y conversión de un sustrato en un producto deseado. La presente invención emplea un enfoque de manipulación metabólica mediante ingeniería único que evita una limitación metabólica que usan las células para regular la síntesis del producto bioquímico oxaloacetato. Específicamente, las células de la presente invención se manipulan genéticamente mediante ingeniería para sobreexpresar una piruvato carboxilasa funcional, en las que una célula de tipo natural comparable carece de una piruvato carboxilasa endógena, con la condición de que dicha célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería no sea una célula de *Escherichia coli* con una producción potenciada de un aminoácido de la familia del aspartato, dando como resultado niveles aumentados de oxaloacetato.

Las células manipuladas genéticamente mediante ingeniería se denominan aquí como células “manipuladas metabólicamente mediante ingeniería” cuando la manipulación genética mediante ingeniería se refiere a la interrupción o alteración de una ruta metabólica para provocar un cambio en el metabolismo del carbono. Una enzima se “sobreexpresa” en una célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería cuando la enzima se expresa en la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería a un nivel mayor que el nivel al que se expresa en una célula de tipo natural comparable. En células que no expresan endógenamente una enzima particular, cualquier nivel de expresión de esa enzima en la célula se considera una “sobreexpresión” de esa enzima, para los fines de la presente invención.

Muchos organismos pueden sintetizar oxaloacetato a partir de PEP vía la enzima PEP carboxilasa, o a partir de piruvato vía la enzima, dependiente de biotina, piruvato carboxilasa. Representantes de esta clase de organismos incluyen *C. glutamicum*, *R. etli*, *P. fluorescens*, *Pseudomonas citronellolis*, *Azotobacter vinelandii*, *Aspergillus nidulans*, y hepatocitos de rata. Otros organismos no pueden sintetizar directamente oxaloacetato a partir de piruvato debido a que carecen de la enzima piruvato carboxilasa. *E. coli*, *Fibrobacter succinogenes*, y *Ruminococcus flavefaciens* son representantes de esta clase de organismos. En cualquier caso, el enfoque de manipulación metabólica mediante ingeniería de la presente invención se puede usar para redirigir carbono hacia oxaloacetato y, como resultado, potenciar la producción de productos bioquímicos que usen oxaloacetato como un precursor metabólico.

La célula que se manipula metabólicamente mediante ingeniería según la invención no está limitada de ningún modo a ningún tipo particular o clase de célula. Puede ser una célula eucariota o una célula procariota. Puede incluir, pero no se limita a, una célula de un ser humano, un animal, una planta, un insecto, una levadura, un protozoo, una bacteria, o una arqueobacteria. Preferiblemente, la célula es una célula microbiana, más preferiblemente una célula bacteriana. Ventajosamente, la célula bacteriana puede ser una célula de *E. coli*, *C. glutamicum*, *B. flavum* o *B. lactofermentum*; estas cepas se están empleando actualmente de forma industrial para obtener aminoácidos que pueden derivar de oxaloacetato usando procesos de fermentación bacteriana. Las cepas mutantes de *E. coli* se están considerando actualmente para la síntesis comercial de succinato vía fermentación anaerobia (L. Stols *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 63, 2695-2701 (1997); L. Stols *et al.*, Appl. Biochem. Biotech., 63, 153-158 (1997)), aunque en el pasado se consideró a *A. succiniciproducens*. Ahora se está considerando a *Rhizopus fungi* para producir fumarato vía fermentaciones aerobias (N. Cao, Appl. Biochem. Biotechnol., 63, 387-394 (1997); J. Du *et al.*, Appl. Biochem. Biotech., 63, 541-556 (1997)). Las bacterias que carecen de piruvato carboxilasa endógena, tales como *E. coli*, *Fibrobacter succinogenes*, y *R. flavefaciens*, se pueden usar en la estrategia de manipulación metabólica mediante ingeniería descrita por la descripción.

Opcionalmente, la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería se ha manipulado mediante ingeniería para interrumpir, bloquear, atenuar o inactivar una o más rutas metabólicas que retiran carbono del oxaloacetato. Por ejemplo, la alanina y la valina se pueden típicamente biosintetizar directamente a partir de piruvato, e, inactivando las enzimas implicadas en la síntesis de uno o de ambos de estos aminoácidos, se puede incrementar la producción de oxaloacetato. De este modo, la célula modificada metabólicamente mediante ingeniería de la invención puede ser un auxótrofo para la alanina y/o un auxótrofo para la valina, más preferiblemente un auxótrofo para la alanina y/o un auxótrofo para la valina de *C. glutamicum*. Igualmente, la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería se puede manipular mediante ingeniería para reducir o eliminar la producción de PEP carboxinasas, que cataliza la formación de PEP a partir de oxaloacetato (el inverso de la reacción catalizada por PEP carboxilasa). La prevención o reducción de la expresión de una PEP carboxinasas funcional dará como resultado más carbono desviado hacia el oxaloacetato, y por tanto los aminoácidos y ácidos orgánicos biosintetizados a partir de aquél.

Otra alternativa implica interferir con la ruta metabólica usada para producir acetato a partir de acetil-CoA. La interrupción de esta ruta debería dar como resultado mayores niveles de acetil-CoA, lo que entonces puede dar indirectamente como resultado cantidades incrementadas de oxaloacetato. Además, cuando la enzima de piruvato carboxilasa que es expresada en la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería es aquella que es activada por acetil-CoA (véase más abajo), mayores niveles de acetil-CoA en estos mutantes conducen a una actividad incrementada de la enzima, provocando que carbono adicional fluya desde piruvato hacia oxaloacetato. De este modo, los mutantes para el acetato son las células manipuladas metabólicamente mediante ingeniería preferidas.

La piruvato carboxilasa expresada por la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería puede ser endógena o heteróloga. Una enzima heteróloga es aquella que es codificada por una secuencia nucleotídica que normalmente no está presente en la célula. Por ejemplo, una célula bacteriana que se ha transformado con y expresa un gen de una especie o género diferente que codifica una piruvato carboxilasa contiene una piruvato carboxilasa heteróloga. El fragmento de ácido nucleico heterólogo puede o no integrarse en el genoma hospedante. La expresión “piruvato carboxilasa” significa una molécula que tiene actividad de piruvato carboxilasa. Es decir, que es capaz de catalizar la carboxilación de piruvato para producir oxaloacetato. La expresión “piruvato carboxilasa” incluye así enzimas de piruvato carboxilasa de origen natural, junto con fragmentos, derivados, y otras modificaciones químicas, enzimáticas o estructurales de los mismos, incluyendo enzimas codificadas por mutantes de inserción, de supresión o de sitio de genes de piruvato carboxilasa de origen natural, en tanto que se retenga la actividad de piruvato carboxilasa. Las enzimas de piruvato carboxilasa y, en algunos casos, los genes que se han caracterizado incluyen piruvato carboxilasa humana (GenBank K02282; S. Freytag *et al.*, J. Biol. Chem., 259, 12831-12837 (1984)); piruvato carboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank X59890, J03889, y M16595; R. Stucka *et al.*, Mol. Gen. Genet., 229, 305-315 (1991); F. Lim *et al.*, J. Biol. Chem., 263, 11493-11497 (1988); D. Myers *et al.*, Biochemistry, 22, 5090-5096 (1983)); piruvato carboxilasa de *Schizosaccharomyces pombe* (GenBank D78170); piruvato carboxilasa de *R. etli* (GenBank U51439; M. Dunn *et al.*, J. Bacteriol., 178, 5960-5070 (1996)); piruvato carboxilasa de *Rattus norvegicus* (GenBank U81515; S. Jitrapakdee *et al.*, J. Biol. Chem., 272, 20522-20530 (1997)); piruvato carboxilasa de *Bacillus stearothermophilus* (GenBank D83706; H. Kondo, Gene, 191, 47-50 (1997); S. Libor, Biochemistry, 18, 3647-3653 (1979)); piruvato carboxilasa de *P. fluorescens* (R. Silvia *et al.*, J. Gen. Microbiol., 93, 75-81 (1976); y piruvato carboxilasa de *C. glutamicum* (GenBank Y09548).

Preferiblemente, la piruvato carboxilasa expresada por las células manipuladas metabólicamente mediante ingeniería deriva de *R. etli* o *P. fluorescens*. La piruvato carboxilasa en *R. etli* es codificada por el gen *pyc* (M. Dunn *et al.*, J. Bacteriol., 178, 5960-5970 (1996)). La enzima de *R. etli* está clasificada como una piruvato carboxilasa α_4 , que es inhibida por aspartato, y requiere acetil-CoA para su activación. Los miembros de esta clase de piruvato carboxilasas pueden no parecer particularmente muy adecuados para uso en la presente invención, puesto que sería de esperar que la redirección del flujo de carbono desde piruvato a oxaloacetato provocase una producción reducida de acetil-CoA, y una producción incrementada de aspartato, disminuyendo ambas la actividad de piruvato carboxilasa. Sin embargo, se muestra aquí que la expresión de piruvato carboxilasa de *R. etli* en un hospedante bacteriano es eficaz para incrementar la producción de oxaloacetato y sus metabolitos aguas abajo (véanse los Ejemplos I y II). Además, esto se puede lograr sin afectar de forma adversa a la captación de glucosa por el hospedante (véase el Ejemplo III), que ha sido el escollo en esfuerzos previos para desviar carbono hacia oxaloacetato sobreexpresando PEP carboxilasa (P. Chao *et al.*, Appl. Env. Microbiol., 59, 4261-4265 (1993)).

En una realización particularmente preferida, la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería expresa una piruvato carboxilasa $\alpha_4\beta_4$. Los miembros de esta clase de piruvato carboxilasas no requieren acetil-CoA para la activación, ni son inhibidos por aspartato, haciéndolos particularmente muy adecuados para uso en la presente invención. *P. fluorescens* es un organismo que se sabe que expresa una piruvato carboxilasa $\alpha_4\beta_4$. Por lo tanto, la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la invención es preferiblemente aquella que se ha transformado con un fragmento de ácido nucleico aislado de *P. fluorescens* que contiene una secuencia nucleotídica que codifica una piruvato carboxilasa expresada allí, más preferiblemente la piruvato carboxilasa aislada y descrita en R. Silvia *et al.*, J. Gen. Microbiol., 93, 75-81 (1976).

En consecuencia, la invención también describe un fragmento de ácido nucleico aislado de *P. fluorescens*, que incluye una secuencia nucleotídica que codifica una piruvato carboxilasa, más preferiblemente una secuencia nucleotídica que codifica la piruvato carboxilasa aislada y descrita en R. Silvia *et al.*, J. Gen. Microbiol., 93, 75-81 (1976).

ES 2 356 335 T3

La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la invención se obtiene transformando una célula hospedante con un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que tiene actividad de piruvato carboxilasa. Los métodos de transformación de células bacterianas, vegetales y de animales son bien conocidos en la técnica. Los métodos habituales de transformación bacteriana incluyen electroporación y modificación química. La transformación produce una célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería que sobreexpresa piruvato carboxilasa. Las células preferidas y las enzimas de piruvato carboxilasa son como se describe anteriormente en relación con la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la invención. Opcionalmente, las células se transforman adicionalmente con un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que tiene una actividad de PEP carboxilasa, para producir una célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería que también sobreexpresa piruvato carboxilasa, también como se describe anteriormente. La invención se debe entender en sentido amplio para incluir métodos de obtención de las diversas realizaciones de las células manipuladas metabólicamente mediante ingeniería de la invención descritas aquí.

Preferiblemente, el fragmento de ácido nucleico se introduce en la célula usando un vector, aunque también se puede usar "ADN desnudo". El fragmento de ácido nucleico puede ser circular o lineal, monocatenario o bicatenario, y puede ser ADN, ARN, o cualquier modificación o combinación de los mismos. El vector puede ser un plásmido, un vector vírico o un cósmido. La selección de un vector o esqueleto plasmídico depende de una variedad de características deseadas en el constructo resultante, tal como un marcador de selección, la velocidad de reproducción del plásmido, y similares. Los plásmidos adecuados para la expresión en *E. coli*, por ejemplo, incluyen pUC (X), pKK223-3, pKK223-2, pTrc99A, y pET(X), en el que (X) representa una familia de vectores en la que hay disponibles numerosos constructos. Los vectores pUC(X) se pueden obtener de Pharmacia Biotech (Piscataway, NH) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). pKK223-3, pKK223-2 y pTrc99A se pueden obtener de Pharmacia Biotech. Los vectores pET(X) se pueden obtener de Promega (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA) y Novagen (Madison, WI). Para facilitar la replicación dentro de una célula hospedante, el vector incluye preferiblemente un origen de replicación (conocido como un "ori") o replicón. Por ejemplo, habitualmente se usan los replicones ColE1 y Pl5A en plásmidos que se van a propagar en *E. coli*.

El fragmento de ácido nucleico usado para transformar la célula según la invención puede incluir opcionalmente una secuencia promotora ligada operablemente a la secuencia nucleotídica que codifica la enzima a expresar en la célula hospedante. Un promotor es un fragmento de ADN que provoca la transcripción del material genético. La transcripción es la formación de una cadena de ARN según la información genética contenida en el ADN. La invención no está limitada por el uso de ningún promotor particular, y se conoce una amplia variedad. Los promotores actúan como señales reguladoras que se unen a ARN polimerasa en una célula para iniciar la transcripción de una secuencia codificante en dirección 3'. Un promotor está "ligado operablemente" a una secuencia de ácido nucleico si controla o regula, o se puede usar para controlar o regular, la transcripción de esa secuencia de ácido nucleico. El promotor usado en la invención puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Puede ser, aunque no necesita serlo, heterólogo con respecto a la célula hospedante. Los promotores preferidos para la transformación bacteriana incluyen *lac*, *lacUV5*, *tac*, *trc*, T7, SP6 y *ara*.

El fragmento de ácido nucleico usado para transformar la célula hospedante puede incluir, opcionalmente, un sitio de Shine Dalgarno (por ejemplo un sitio de unión a ribosoma) y un sitio de comienzo (por ejemplo, el codón ATG) para iniciar la traducción del mensaje transcrito para producir la enzima. También opcionalmente, puede incluir una secuencia de terminación para terminar la traducción. Una secuencia de terminación es típicamente un codón para el que no existe aminoacil-ARNt correspondiente, terminando así la síntesis del polipéptido. El fragmento de ácido nucleico usado para transformar la célula hospedante puede incluir opcionalmente además una secuencia de terminación de la transcripción. Los terminadores *rmB*, que es un tramo de ADN que contiene dos terminadores, T1 y T2, es el terminador más usado habitualmente que se incorpora en sistemas de expresión bacteriana (J. Brosius *et al.*, J. Mol. Biol., 148, 107-127 (1981)).

El fragmento de ácido nucleico usado para transformar la célula hospedante incluye opcionalmente una o más secuencias marcadoras, que codifican típicamente un producto genético, habitualmente una enzima, que inactiva o de otro modo detecta o es detectada por un compuesto en el medio de crecimiento. Por ejemplo, la inclusión de una secuencia marcadora puede hacer a la célula transformada resistente a un antibiótico, o puede conferir metabolismo específico del compuesto a la célula transformada. Los ejemplos de una secuencia marcadora son secuencias que confieren resistencia a canamicina, ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina.

En una realización preferida, la célula hospedante, preferiblemente *E. coli*, *C. glutamicum*, *B. flavum* o *B. lactofermentum*, se transforma con un fragmento de ácido nucleico que comprende un gen piruvato carboxilasa, preferiblemente un gen que es aislado de *R. etli* o *P. fluorescens*, más preferiblemente el gen *pyc* de *R. etli*, de forma que el gen es transcrito y expresado en la célula hospedante para provocar una producción incrementada de oxaloacetato y, en consecuencia, una producción incrementada del metabolito de interés aguas abajo, con relación a una célula de tipo natural comparable.

La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la invención sobreexpresa piruvato carboxilasa. Dicho de otra manera, la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería expresa piruvato carboxilasa a un nivel mayor que el nivel de piruvato carboxilasa expresado en una célula de tipo natural comparable. Esta comparación se puede realizar de un número cualquiera de formas por un experto en la técnica, y se hace en condiciones de crecimiento comparables. Por ejemplo, la actividad de piruvato carboxilasa se puede cuantificar y comparar usando el

método de Payne y Morris (J. Gen. Microbiol., 59, 97-101 (1969)). La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería que sobreexpresa piruvato carboxilasa producirá en este ensayo una actividad mayor que una célula de tipo natural. Además, o como alternativa, la cantidad de piruvato carboxilasa se puede cuantificar y comparar preparando extractos proteicos de las células, sometiéndolos a SDS-PAGE, transfiriéndolos a una transferencia Western, detectando después la proteína piruvato carboxilasa biotinilada usando kits de detección que están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Pierce Chemical Company (Rockford, IL), Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) o Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) para visualizar proteínas biotiniladas sobre transferencias Western. En algunas células hospedantes adecuadas, la expresión de piruvato carboxilasa en la célula de tipo natural, no manipulada por ingeniería, puede estar por debajo de los niveles detectables.

Opcionalmente, la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la invención también sobreexpresa PEP carboxilasa. En otras palabras, la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería expresa opcionalmente PEP carboxilasa a un nivel mayor que el nivel de PEP carboxilasa expresado en una célula de tipo natural comparable. Nuevamente, esta comparación se puede hacer de cualquier número de formas por un experto en la técnica, y se realiza en condiciones de crecimiento comparables. Por ejemplo, la actividad de PEP carboxilasa se puede ensayar, cuantificar y comparar. En un ensayo, la actividad de PEP carboxilasa se mide en ausencia de ATP, usando PEP en lugar de piruvato como sustrato, monitorizando la aparición de la formación de tionitrobenzoato dependiente de CoA a 412 nm (véase el Ejemplo III). La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería que sobreexpresa PEP carboxilasa producirá una actividad de PEP carboxilasa mayor que una célula de tipo natural. Además, o como alternativa, la cantidad de PEP carboxilasa se puede cuantificar y comparar preparando extractos proteicos de las células, sometiéndolos a SDS-PAGE, transfiriéndolos a una transferencia Western, detectando después la proteína PEP carboxilasa usando anticuerpos anti-PEP en conjunción con kits de detección disponibles de Pierce Chemical Company (Rockford IL), Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) o Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) para visualizar complejos de antígeno-anticuerpo en transferencias Western. En una realización preferida, la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería expresa PEP carboxilasa derivada de una cianobacteria, más preferiblemente *Anacystis nidulans*.

La invención incluye además un método para producir un producto bioquímico derivado de oxaloacetato potenciando o aumentando la producción del producto bioquímico en una célula que es, antes de la transformación como se describe aquí, capaz de biosintetizar el producto bioquímico. La célula se transforma con un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que tiene actividad de piruvato carboxilasa, la enzima se expresa en la célula para provocar una producción incrementada del producto bioquímico con relación a una célula de tipo natural comparable, y el producto bioquímico se aísla de la célula según métodos conocidos. Los productos bioquímicos se pueden aislar de las células manipulada metabólicamente mediante ingeniería usando protocolos, métodos y técnicas que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido succínico se puede aislar mediante electrodiálisis (D. Glassner, patente U.S. n° 5.143.833 (1992)) o mediante precipitación como succinato de calcio (R. Datta, patente U.S. n° 5.143.833 (1992)); el ácido málico se puede aislar mediante electrodiálisis (R. Siepenbusch, patente U.S. n° 4.874.700 (1989)); la lisina se puede aislar mediante adsorción/ósmosis inversa (T. Kaneko *et al.*, patente U.S. n° 4.601.829 (1986)). Las células hospedantes preferidas, los productos bioquímicos derivados de oxaloacetato, y las enzimas piruvato carboxilasa son como se describe aquí.

Los productos bioquímicos que se producen o sobreproducen en, y se aíslan de, las células manipulada metabólicamente mediante ingeniería según el método de la invención son aquellos que derivan o pueden derivar metabólicamente de oxaloacetato (es decir, con respecto a los cuales el oxaloacetato es un precursor metabólico). Estos productos bioquímicos derivados de oxaloacetato incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos tales como lisina, asparagina, aspartato, metionina, treonina, arginina, glutamato, glutamina, prolina e isoleucina; ácidos orgánicos tales como succinato, malato, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinil-CoA y fumarato; nucleótidos de pirimidina; y porfirinas tales como citocromos, hemoglobinas, clorofilas, y similares. Se entenderá que los términos usados aquí para describir ácidos (por ejemplo, los términos succinato, aspartato, glutamato, malato, fumarato, y similares) no pretenden representar ningún estado particular de ionización del ácido, y pretenden incluir formas tanto protonadas como no protonadas del compuesto. Por ejemplo, los términos aspartato y ácido aspártico se refieren al mismo compuesto, y se usan de forma intercambiable, así como succinato y ácido succínico, malato y ácido málico, fumarato y ácido fumárico, etc. Como es bien conocido en la técnica, el estado de protonación del ácido depende del pK_a del grupo ácido y del pH del medio. A pH neutro, los ácidos descritos aquí están típicamente no protonados.

En un método particularmente preferido, la lisina y el succinato se producen en y se obtienen a partir de una célula bacteriana manipulada metabólicamente mediante ingeniería que expresa piruvato carboxilasa, preferiblemente piruvato carboxilasa derivada de *R. etli* o *P. fluorescens*. Se ha de entender ampliamente que el método de la invención incluye la producción y aislamiento de cualquier o todos los productos bioquímicos derivados de oxaloacetato recuperados o recuperables de las células manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la invención, independientemente de si los productos químicos se sintetizan realmente a partir de oxaloacetato según las rutas metabólicas mostradas en las Figs. 1-3 o cualesquiera otras rutas metabólicas actualmente conocidas.

Las ventajas de la invención se ilustran mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, los materiales particulares y sus cantidades citados en estos ejemplos, así como otras condiciones y detalles, se han de interpretar para aplicarlos ampliamente en la técnica, y no se han de entender para que restrinjan indebidamente o limiten la invención de ningún modo.

ES 2 356 335 T3

Ejemplo 1

Expresión de la Enzima Piruvato Carboxilasa de R. etli que Permite E. coli Convertir Piruvato en Oxaloacetato

5 Materiales y métodos

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento. Las cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio se enumeran en la Tabla 1. Se hicieron crecer cepas de *E. coli* en caldo LB de Miller (rico) o en medio mínimo M9 (J. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1972)).
 10 Las cepas que poseen un plásmido se suplementaron con el antibiótico apropiado para detectar el gen marcador; se usó ampicilina a 100 µg/ml en medio rico, y 50 µg/ml en medio mínimo, mientras que se usó cloranfenicol a 20 µg/ml en medio rico, y 10 µg/ml en medio mínimo. Cuando se usó isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para inducir el constructo pUC 18-*pyc*, se añadió a una concentración final de 1 mM.

15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 TABLA 1
Cepas y Plásmidos

Cepas	Genotipo	Referencia o fuente
20	MC1061	<i>araD139 Δ(araABOIC-leu)</i>
		<i>7679 Δ(lac)74 galU galK rpsL</i>
25		<i>hsr hsm+</i>
	ALS225	MC1061 F' <i>lac</i> ^{q1} Z+Y+A+
	MG1665	Wt
30		E. Altman, University of Georgia
		M. Guyer et al., <u>Quant. Biol., Cold Spring Harbor Symp.</u> , <u>45</u> , 135-140 (1980)
35	JCL 1242	<i>Δ(argF-lac)U169 ppc::Kn</i>
		P. Chao et al., <u>Appl. Env. Microbiol.</u> , <u>59</u> , 4261-4265 (1993)
Plásmidos	Características relevantes	Referencia o fuente
40	pUC18	Amp(R), ColE1 ori
		J. Norrander et al., <u>Gene.</u> , <u>26</u> , 101-106 (1983)
45	pPC1	Tet(R), <i>pyc</i>
		M. Dunn et al., <u>J. Bacteriol.</u> , <u>178</u> , 5960-5970 (1996)
50	pUC18- <i>pyc</i>	Amp(R), <i>pyc</i> regulado por <i>P_{lac}</i> , ColE1 ori
	pBA11	Cam(R), <i>birA</i> , P15A ori
		D. Barker et al., <u>J. Mol. Biol.</u> , <u>146</u> , 469-492 (1981)

Construcción de pUC18-pyc. El gen *pyc* de *R. etli*, que codifica piruvato carboxilasa, se amplificó usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se usó Pfu polimerasa (Stratagene, La Jolla, CA) en lugar de Taq polimerasa, y el plásmido pPC1 sirvió como el molde de ADN. Los cebadores se diseñaron basándose en la secuencia del gen *pyc* publicada (M. Dunn *et al.*, J. Bacteriol., 178, 5960-5970 (1996)) para convertir las señales del comienzo traduccional de *pyc* para hacerlas concordar con las del gen *lacZ*. Estos cebadores también introdujeron un sitio de restricción *KpnI* (GGTACC) al comienzo del fragmento amplificado, y un sitio de restricción *BgIII* (AGATCT) al final del fragmento amplificado; cebador directo 5'TAC TAT GGT ACC TTA GGA AAC AGC TAT GCC CAT ATC CAA GAT ACT CGT T 3' (SEQ ID NO:1), cebador inverso 5'ATT CGT ACT CAG GAT CTG AAA GAT CTA ACA GCC TGA CTT TAC ACA ATC G 3' (SEQ ID NO:2) (los sitios de *KpnI*, Shine Dalgarno, de comienzo ATG, y de *BgIII* están subrayados). El fragmento de 3,5 kb resultante se aisló en gel, se restringió con *KpnI* y *BgIII*, y después se ligó a ADN de pUC18 aislado en gel, que se había restringido con *KpnI* y *BamHI*, para formar el constructo pUC18-*pyc*. Este constructo, identificado como "plásmido en pUC18-*pyc* de *E. coli* ALS225", se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209, USA, y se le asignó el número ATCC 207111. El depósito se recibió en la ATCC el 16 de febrero de 1999.

Geles de proteínas y transferencia Western. Los extractos celulares desnaturizados por calor se separaron en geles al 10% de SDS-PAGE según Altman *et al.* (J. Bact., 155, 1130-1137 (1983)) y se llevaron a cabo transferencias Western según Carroll y Gherardini (Infect. Immun., 64, 392-398 (1996)). Las células ALS225 de *E. coli*, que contienen pUC18 o pUC18-*pyc*, se hicieron crecer hasta fase semilogarítmica en medio rico a 37°C, tanto en presencia como en ausencia de IPTG. Debido a que ALS225 contiene *lacI^{q1}* en el F', la inducción significativa del constructo pUC18-*pyc* no debería de ocurrir excepto que se añadiese IPTG. Se prepararon extractos proteicos, se sometieron a SDS-PAGE, y se transfirieron mediante transferencia Western. Las proteínas que se habían biotinilado *in vivo* se detectaron entonces usando el kit de detección de proteínas Sigma-Blot (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO). Se siguieron las instrucciones del fabricante, excepto que durante el desarrollo de las transferencias Western se omitió la etapa de biotinilación de las proteínas, permitiendo así la detección de sólo aquellas proteínas que se habían biotinilado *in vivo*.

Ensayo enzimático de piruvato carboxilasa (PC). Para las medidas de la actividad de piruvato carboxilasa, se cosecharon 100 ml de cultivo de fase semilogarítmica mediante centrifugación a 7.000 x g durante 15 minutos a 4°C, y se lavaron con 10 ml de 100 mM de Tris-Cl (pH 8,0). Las células se resuspendieron entonces 4 ml de 100 mM de Tris-Cl (pH 8,0), y se sometieron subsiguientemente a destrucción celular mediante ultrasonidos. El desecho celular se eliminó por centrifugación a 20.000 x g durante 15 minutos a 4°C. La actividad de piruvato carboxilasa se midió mediante el método de Payne y Morris (J. Gen. Microbiol., 59, 97-101 (1969)). En este ensayo, el oxaloacetato producido por piruvato carboxilasa se convierte en citrato mediante adición de citrato sintetasa en presencia de acetil-CoA y 5,5-ditio-bis(2-nitro-benzoato) (DNTB) (Aldrich Chemical Co.); la enzima de piruvato carboxilasa homotetramérica de *R. etli* requiere acetil coenzima A para su activación. Se monitorizó, primero tras la adición de piruvato y después tras la adición de ATP, la velocidad de incremento de la absorbancia a 412 nm debido a la presencia de formación dependiente de CoA del 5-tio-2-nitrobenzoato. La diferencia entre estas dos velocidades se tomó como la actividad de piruvato carboxilasa dependiente de ATP. La concentración de los componentes de la reacción por mililitro de mezcla fue la siguiente: 100 mM de Tris-Cl (pH 8,0), 5 mM de MgCl₂·H₂O, 50 mM de NaHCO₃, 0,1 mM de acetil-CoA, 0,25 mM de DTNB, y 5 unidades (U) de citrato sintetasa. El piruvato, ATP, ADP, o aspartato, se añadieron como se especifica en la sección de Resultados, más abajo. La reacción se comenzó añadiendo 50 µl de extracto celular. Una unidad de actividad de piruvato carboxilasa corresponde a la formación de un µmol de 5-tio-2-nitrobenzoato por mg de proteína por minuto. Todos los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo por triplicado, y se observó un error estándar menor que 10%. La proteína total en los extractos celulares se determinó mediante el método de Lowry (O. Lowry *et al.*, J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)).

Resultados

Expresión de la enzima piruvato carboxilasa de R. etli en E. coli. El gen *pyc* de *R. etli*, que codifica piruvato carboxilasa, se amplificó mediante PCR a partir de pPC1, y se subclonó en el vector de clonación/expresión pUC18 como se describe anteriormente. Debido a que las señales de comienzo traduccional del gen *pyc* de *R. etli* no fueron óptimas (*pyc* de *R. etli* usa el codón de comienzo TTA raro, así como una distancia espaciadora corta entre la Shine Dalgarno y el codón de comienzo), las señales de comienzo traduccional se convirtieron para que concordasen con la del gen *lacZ* que se puede expresar en niveles elevados en *E. coli* usando una variedad de vectores de expresión. Cuando extractos celulares inducidos del constructo pUC18-*pyc* se ensayaron vía transferencias Western desarrolladas para detectar proteínas biotiniladas, se detectó una banda de alrededor de 120 kD. Este valor es consistente con la evaluación del tamaño previamente dada a conocer para la enzima piruvato carboxilasa de *R. etli* (M. Dunn *et al.*, J. Bacteriol., 178, 5960-5970 (1996)). Comparando diluciones en serie de la piruvato carboxilasa que se expresó a partir del constructo pUC18-*pyc* con enzima piruvato carboxilasa purificada obtenida comercialmente, se determinó que, bajo condiciones completamente inducidas, la piruvato carboxilasa de *R. etli* estaba siendo expresada a 1% de la proteína celular total en *E. coli*.

Efectos de biotina y biotina holoenzima sintetasa sobre la expresión de piruvato carboxilasa biotinilada de R. etli en E. coli. La piruvato carboxilasa es una enzima dependiente de la biotina, y media la formación de oxaloacetato mediante una carboxilación de piruvato en dos etapas. En la primera etapa de reacción, la biotina se carboxila con ATP y bicarbonato como sustratos, mientras que en la segunda reacción el grupo carboxilo de la carboxibiotina se transfiere a piruvato. Se ha encontrado que todas las piruvato carboxilasas estudiadas hasta la fecha son dependientes de biotina, y existen como proteínas multiméricas, pero el tamaño y estructura de las subunidades asociadas pueden variar considerablemente. Se ha demostrado que las piruvato carboxilasas de diferentes bacterias forman estructuras α_4 o $\alpha_4\beta_4$, oscilando el tamaño de la subunidad α entre 65 y 130 kD. Sin embargo, en todos los casos, se ha demostrado que la subunidad α de la enzima piruvato carboxilasa contiene tres dominios catalíticos -un dominio de biotina carboxilasa, un dominio de transcarboxilasa, y un dominio de proteína portadora de carboxibiotina- que trabajan colectivamente para catalizar la conversión en dos etapas de piruvato en oxaloacetato. En la primera etapa, un grupo prostético de biotina enlazado a un resto de lisina es carboxilado con ATP y HCO₃⁻, mientras que, en la segunda etapa, el grupo carboxilo es transferido a piruvato. La biotinilación de la piruvato carboxilasa se produce post-traduccionalmente, y es catalizada por la enzima biotin holoenzima sintetasa. En este experimento, células de *E. coli* que contienen el constructo pUC18-*pyc* se hicieron crecer en condiciones inductoras en medio definido mínimo que no contiene de biotina añadida, o que contiene biotina añadida a 50 ó 100 ng/ml. Específicamente, se hicieron crecer células MG1655 pUC18-*pyc* hasta fase semilogarítmica a 37°C en medio M9 que contenía cantidades variables de biotina. Se prepararon extractos proteicos, se sometieron a SDS-PAGE, y se transfirieron mediante transferencia Western. Las proteínas que se habían biotinilado *in vivo* se detectaron entonces usando el kit de detección de proteínas Sigma-Blot, como se describe anteriormente. En este experimento se usó MG1655 debido a que crece significativamente más rápido que

ALS225 en medio mínimo. Debido a que MG1655 no contiene *lacI*^H, se pudo lograr la expresión máxima de piruvato carboxilasa sin añadir IPTG. La cantidad de piruvato carboxilasa biotinilada que estaba presente en cada muestra se cuantificó usando Stratagene Eagle Eye II Still Video. La biotinilación de piruvato carboxilasa que se expresó a partir del constructo pUC18-*pyc* se vio claramente afectado por los niveles de biotina. Las células que tuvieron que producir toda su biotina *de novo* expresaron cantidades significativamente menores de proteína biotinilada. La adición de biotina a una concentración final de 50 ng/ml fue suficiente para biotinar toda la piruvato carboxilasa que se expresó vía el constructo pUC18-*pyc*.

Puesto que la biotinilación post-traducciona de piruvato carboxilasa se lleva a cabo por la enzima biotin holoenzima sintetasa, se investigó el efecto del exceso de biotin holoenzima sintetasa sobre la biotinilación de piruvato carboxilasa. Este análisis se logró introduciendo el plásmido pBA11 de múltiples copias (que contiene el gen *birA* que codifica biotin holoenzima sintetasa) en células de *E. coli* que también alojaron el constructo pUC18-*pyc*; pBA11 es un derivado de pACYC184, y de este modo es compatible con pUC18-*pyc*. Los efectos del exceso de enzima biotin holoenzima sintetasa se examinaron en medio rico, en el que la biotina también estaba presente en exceso. Específicamente, células ALS225, que contienen pUC18-*pyc* o pBA11, se hicieron crecer hasta fase semilogarítmica a 37°C en medio rico que contenía IPTG. Se prepararon extractos proteicos, se sometieron a SDS-PAGE, y se transfirieron mediante transferencia Western, y las proteínas que se habían biotinilado *in vivo* se detectaron entonces usando el kit de detección de proteínas Sigma-Blot como se describe anteriormente. Barker *et al.* (J. Mol. Biol., 146, 469-492 (1981)) han demostrado que pBA11 provoca un incremento de 12 veces en los niveles de la enzima biotin holoenzima sintetasa. La cantidad de piruvato carboxilasa biotinilada que estaba presente en cada muestra se cuantificó usando el sistema Stratagene Eagle Eye II Still Video. Los extractos proteicos preparados a partir de células que contenían sólo pUC18-*pyc* o tanto pUC18-*pyc* o pBA11 produjeron cantidades iguales de proteína piruvato carboxilasa biotinilada. Este resultado sugiere que una única copia cromosómica de *birA* es suficiente para biotinar toda la piruvato carboxilasa que es expresada cuando la biotina está presente en exceso.

Piruvato carboxilasa de R. etli puede convertir piruvato en oxaloacetato en E. coli. Para confirmar que la proteína piruvato carboxilasa expresada fue enzimáticamente activa en *E. coli*, se empleó el ensayo enzimático acoplado desarrollado por Payne y Morris para evaluar la actividad de piruvato carboxilasa (J. Payne *et al.*, J. Gen. Microbiol., 59, 97-101 (1969)). Se ensayaron extractos celulares que contienen el constructo pUC18-*pyc* inducido (MG1655 pUC18-*pyc*) para determinar la actividad de piruvato carboxilasa usando cantidades variables de piruvato, y se compararon con los controles que contienen el constructo pUC18 (MG1655 pUC18). Se añadió ATP a una concentración final de 5 mM a la mezcla de reacción, y la actividad de piruvato carboxilasa se determinó en presencia de cantidades crecientes de piruvato. La Fig. 5 muestra que las células de *E. coli* que poseen el constructo pUC18-*pyc* pudieron convertir de hecho la piruvato en oxaloacetato, y que la actividad de piruvato carboxilasa observada siguió la cinética de Michaelis-Menten. Una gráfica de Lineweaver-Burke de estos datos reveló que la constante de saturación (K_m) para la piruvato carboxilasa expresada fue 0,249 mM con respecto a piruvato. Este valor está muy de acuerdo con otras enzimas piruvato carboxilasa que se han estudiado (H. Feir *et al.*, Can. J. Biochem., 47, 698-710 (1969); H. Modak *et al.*, Microbiol., 141, 2619-2628 (1995); M. Scrutton *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 164, 641-654 (1974)).

Está bien documentado que las enzimas piruvato carboxilasa α_4 pueden ser inhibidas por aspartato o por difosfato de adenosina (ADP). El aspartato es el primer aminoácido que se sintetiza a partir de oxaloacetato, y ADP se libera cuando la piruvato carboxilasa convierte piruvato en oxaloacetato. Se evaluó la actividad de piruvato carboxilasa en presencia de cada uno de estos inhibidores usando extractos de células MG1655 que contenían el constructo pUC18-*pyc*. El efecto de aspartato se analizó añadiendo ATP y piruvato a la mezcla de reacción hasta concentraciones finales de 5 mM y 6 mM, respectivamente, y determinando entonces la actividad de piruvato carboxilasa en presencia de cantidades crecientes de aspartato. La Fig. 6 muestra la actividad de piruvato carboxilasa que se obtuvo en presencia de diferentes concentraciones de aspartato. Como era de esperar, la actividad de piruvato carboxilasa fue inhibida por aspartato, y la actividad específica disminuyó hasta aproximadamente 43% en presencia de 8 mM de aspartato. El efecto de ADP se analizó añadiendo piruvato a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 5 mM, y determinando entonces la actividad de piruvato carboxilasa en presencia de cantidades crecientes de ATP. La Fig. 7 muestra que ADP afectó de forma importante la actividad de piruvato carboxilasa observada, y actuó como un inhibidor competitivo de ATP. Una gráfica de Lineweaver-Burke de estos datos reveló que la constante de saturación (k_m) para piruvato carboxilasa expresada fue 0,193 mM con respecto a ATP, y que la constante de inhibición para ADP fue 0,142 mM. Nuevamente, estos valores estaban muy de acuerdo con otras enzimas piruvato carboxilasas que se habían estudiado (H. Feir *et al.*, Can. J. Biochem., 47, 698-710 (1969); H. Modak *et al.*, Microbiol., 141, 2619-2628 (1995); M. Scrutton *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 164, 641-654 (1974)).

Para mostrar que la expresión de piruvato carboxilasa de *R. etli* en *E. coli* puede desviar verdaderamente el flujo de carbono desde piruvato hacia oxaloacetato, se ensayó si el constructo pUC18-*pyc* permitiría que una cepa de *E. coli*, que contenía un alelo nulo de *ppc* (*ppc* codifica PEP carboxilasa), creciese en medio de glucosa mínimo. Debido a que *E. coli* carece de piruvato carboxilasa, y de este modo sólo es capaz de sintetizar oxaloacetato a partir de PEP (véase la Fig. 3), las cepas de *E. coli* que contienen un gen *ppc* trastornado no pueden crecer en medio mínimo que utiliza glucosa como la única fuente de carbono (P. Chao *et al.*, Appl. Env. Microbiol., 59, 4261-4265 (1993)). La estirpe celular usada para este experimento fue JCL1242 (*ppc::kan*), que contiene un casete resistente a canamicina que se ha insertado en el gen *ppc* y de este modo no expresa la enzima PEP carboxilasa. Las células JCL1242, que contienen pUC18 o el constructo pUC18-*pyc*, se colocaron sobre placas con medio mínimo de glucosa M9 suplementadas con tiamina, ampicilina e IPTG, y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Como se muestra en la Fig. 8, las células de *E. coli* que contienen tanto el alelo nulo de *ppc* como el constructo pUC18-*pyc* fueron capaces de crecer en las placas con

ES 2 356 335 T3

medio mínimo de glucosa. Esta complementación demuestra que se puede crear un punto de ramificación al nivel de piruvato, lo que da como resultado el reencaminamiento del flujo de carbono hacia oxaloacetato, y muestra claramente que piruvato carboxilasa es capaz de desviar el flujo de carbono de piruvato a oxaloacetato en *E. coli*.

5 Ejemplo II

La Expresión de Piruvato Carboxilasa de R. etli Provoca una Producción Incrementada de Succinato en E. coli

10 Materiales y métodos

Cepas bacterianas y plásmidos. En la Tabla 2 se enumeran las cepas de *E. coli* usadas en este estudio. La cepa mutante de lactato deshidrogenasa, denominada RE02, derivó de MG1655 mediante transducción del fago P1 usando la cepa NZN111 de *E. coli* (P. Bunch *et al.*, Microbiol., 143, 187-195 (1997)).

TABLA 2

Cepas y plásmidos usados

Cepas	Genotipo	Referencia o fuente
MG1655	Tipo natural	M. Guyer et al., <u>Quant. Biol., Cold Spring Harbor Symp.</u> , <u>45</u> , 135-140 (1980)
RE02	MG1655 <i>ldh</i>	Este ejemplo
Plásmidos	Características relevantes	Referencia o fuente
pUC18- <i>pyc</i>	Amp(R), <i>pyc</i> regulado por <i>Ejemplo 1</i> <i>Plac</i>	
pTrc99A	Amp(R), <i>lacI^q</i> , <i>P_{trc}</i>	E. Amann et al., <i>Gene</i> , 69:301-315 (1988)
pTrc99A- <i>pyc</i>	Amp(R), <i>lacI^q</i> , <i>pyc</i> regulado por <i>P_{trc}</i>	Este ejemplo

El gen *pyc* de *R. etli* se clonó originalmente bajo el control del promotor *lac* (Ejemplo I). Debido a que este promotor está sometido a represión catabólica en presencia de glucosa, se ligó un fragmento *XbaI-KpnI* de 3,5 kb procedente de pUC18-*pyc* en el vector de expresión pTrc99A, que se había digerido con *XbaI* y *KpnI*. El nuevo plásmido se denominó pTrc99A-*pyc*. Este plásmido, definido como “plásmido en pTrc99A-*pyc* de ALS225 de *E. coli*”, se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209, USA, y se le asignó el número ATCC 207112. El depósito se recibió por la ATCC el 16 de febrero de 1999. En este nuevo constructo, la transcripción del gen *pyc* está bajo el control del promotor *trc* artificial, y de este modo no está sometida a la represión catabólica en presencia de glucosa.

Medios y condiciones de crecimiento. Para la construcción de la cepa, se hicieron crecer cepas de *E. coli* en medio de Luria-Bertani (LB). Se llevaron a cabo fermentaciones anaerobias en botellas de suero de 100 ml con 50 ml de medio LB suplementado con 20 g/l de glucosa y 40 g/l de MgCO₃. Las fermentaciones se terminaron a las 24 horas, en cuyo momento los valores de pH de todas las fermentaciones fueron aproximadamente pH 6,7, y la glucosa se utilizó completamente. Para la cepas que contienen el plásmido, se usó ampicilina o carbenicilina para introducir presión selectiva durante la fermentación. Cada uno de estos antibióticos se introdujo inicialmente a 100 µg/ml. En un conjunto de experimentos, no se añadió ningún antibiótico adicional durante la fermentación, mientras que, en un segundo conjunto de experimentos, se añadieron 50 µg/ml adicionales a las 7 horas y a las 14 horas. La piruvato carboxilasa se indujo añadiendo 1 mM de IPTG. Para los ensayos enzimáticos, las células se hicieron crecer en medio LB suplementado con 20 g/l de glucosa y tamponado con 3,2 g/l de Na₂CO₃.

Análisis de los productos de la fermentación y ensayos enzimáticos. La glucosa, el succinato, el acetato, el formiato, el lactato, el piruvato y el etanol se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) usando una columna de exclusión iónica Coregel 64-H (Interactive Chromatography, San José, CA) y un detector del índice de refracción diferencial (Modelo 410, Waters, Milford, MA). El eluyente fue 4 mN de H₂SO₄, y la columna se mantuvo a 60°C.

ES 2 356 335 T3

Para las medidas de la actividad enzimática, se cosecharon 50 ml de cultivo en fase semilogarítmica mediante centrifugación (10000 x g durante 10 minutos a 4°C) y se lavaron con 10 ml de tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,0). Las células se resuspendieron entonces en 2 ml de tampón Tris-HCl 100 mM, y se sometieron a destrucción celular mediante ultrasonidos. Los desechos celulares se eliminaron mediante centrifugación (20000 x g durante 15 minutos a 4°C). Entonces se midió la actividad de piruvato carboxilasa (J. Payne *et al.*, J. Gen. Microbiol. 59, 97-101 (1969); véase también el Ejemplo I), y las actividades endógenas de PEP carboxilasa (K. Terada *et al.*, J. Biochem., 109, 49-54 (1991)), malato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa (P. Bunch *et al.*, Microbiol., 143, 187-195 (1997)). La proteína total en el extracto celular se determinó usando el método de Lowry.

Resultados

La Tabla 3 muestra que la actividad de piruvato carboxilasa se pudo detectar cuando el constructo pTrc99A-*pyc* se introdujo en células de tipo natural (MG1655) o células de tipo natural que contenían una mutación nula de *ldh*⁻ (RE02). La presencia de IPTG no afectó significativamente la expresión de otras enzimas metabólicas importantes, tales como PEP carboxilasa, lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa.

TABLA 3

Actividad enzimática en cultivos de fase exponencial

Cepa	IPTG	Piruvato carboxilasa	Actividad esp. (μmol/min. mg de proteína)		
			PEP carboxilasa	Lactato deshidrogenasa	Malato deshidrogenasa
MG 1655	-	0,00	0,15	0,31	0,06
	+	0,00	0,18	0,38	0,06
MG1655 pTrc99A- <i>pyc</i>	-	0,00	0,15	0,32	0,05
	+	0,22	0,11	0,32	0,05
RE02	-	0,00	0,15	0,00	0,04
	+	0,00	0,13	0,00	0,04
RE02 pTrc99A- <i>pyc</i>	-	0,00	0,15	0,00	0,04
	+	0,32	0,12	0,00	0,05

A fin de elucidar el efecto de la expresión de piruvato carboxilasa sobre la distribución de los productos finales de la fermentación, se llevaron a cabo varias fermentaciones en botellas de suero de 50 ml (véase la Tabla 4).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 4: Efecto de piruvato carboxilasa sobre la distribución de productos a partir de la fermentación de glucosa en *E. coli*.

Cepa	Anti-biótico	Modo de adición del antibiótico	Piruvato (g/l)	Succinato (g/l)	Lactato (g/l)	Formiato (g/l)	Acetato (g/l)	Etanol (g/l)
MG1655 (wt)	-	-	0,00 (0,00)	1,57 (0,17)	4,30 (0,73)	4,34 (0,50)	3,34 (0,36)	2,43 (0,24)
MG1655 pTrc99A- <i>pyc</i>	Amp	1x	0,00 (0,00)	4,36 (0,45)	2,22 (0,49)	3,05 (0,57)	3,51 (0,03)	2,27 (0,30)
MG1655 pTrc99A- <i>pyc</i>	Car	1x	0,00 (0,00)	4,42 (0,44)	2,38 (0,76)	2,94 (0,46)	3,11 (0,36)	2,27 (0,36)
MG1655pTrc99A- <i>pyc</i>	Amp	3x	0,00 (0,00)	4,41 (0,07)	1,65 (0,08)	4,17 (0,15)	3,93 (0,11)	2,91 (0,34)
MG1655 pTrc99A- <i>pyc</i>	Car	3x	0,00 (0,00)	4,37 (0,06)	1,84 (0,07)	4,09 (0,08)	3,88 (0,06)	2,58 (0,09)

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

Cepa	Anti- biótico	Modo de adición del antibiótico	Piruvato (g/l)	Succinato (g/l)	Lactato (g/l)	Formiato (g/l)	Acetato (g/l)	Etanol (g/l)
RE02 (<i>ldh</i> -)	-	-	0,61 (0,06)	1,73 (0,12)	0,00 (0,00)	6,37 (0,46)	4,12 (0,30)	3,10 (0,26)
RE02 pTrc99A- <i>pyc</i>	Amp	1x	0,33 (0,11)	2,92 (0,12)	0,00 (0,00)	5,38 (0,12)	4,09 (0,16)	2,53 (0,03)
RE02 pTrc99A- <i>pyc</i>	Car	1x	0,25 (0,05)	2,99 (0,55)	0,00 (0,00)	5,50 (0,90)	4,23 (0,71)	2,50 (0,44)
RE02pTrc99A- <i>pyc</i>	Amp	3x	0,30 (0,04)	2,74 (0,07)	0,00 (0,00)	6,48 (0,04)	4,75 (0,06)	2,99 (0,03)
RE02pTrc99A- <i>pyc</i>	Car	3x	0,33 (0,04)	2,65 (0,05)	0,00 (0,00)	6,21 (0,18)	4,60 (0,12)	3,05 (0,07)

Los antibióticos se añadieron de una vez a 0 horas a una concentración de 100 µg/ml (1x), o se añadieron a 0 horas a una concentración de 100 µg/ml y nuevamente a las 7 horas y 14 horas a 50 µg/ml (3x). Los valores son la media de tres réplicas, y las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis. Para calcular el rendimiento neto de cada producto por gramo de glucosa consumida, la concentración del producto final se divide entre 20 g/l de glucosa.

ES 2 356 335 T3

Como se muestra en la Tabla 4, la expresión de piruvato carboxilasa provocó un incremento significativo en la producción de succinato tanto en MG1655 (tipo natural) como RE02 (*ldh*⁻). Con MG1655, la inducción de piruvato carboxilasa incrementó la producción de succinato 2,7 veces, desde 1,57 g/l en la cepa de control hasta 4,36 g/l, haciendo de este modo al succinato el producto principal de la fermentación de glucosa. Este incremento en el succinato estuvo acompañado de una disminución de la formación de lactato y formiato, indicando que el carbono se desvió desde el lactato hacia la formación de succinato. Un desvío similar del carbono, de lactato hacia succinato, se logró previamente mediante la sobreexpresión de PEP carboxilasa natural (C. Millard *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 62, 1808-1810 (1996)). La Tabla 4 también muestra que la ampicilina y carbenicilina fueron igualmente eficaces manteniendo suficiente presión selectiva, y que la adición de más cantidad de cualquiera de los antibióticos durante la fermentación no potenció adicionalmente la producción de succinato. Este hecho indica que una dosis inicial (de 100 µg/ml) es suficiente para mantener la presión selectiva durante la fermentación, un resultado que puede ser debido al pH final relativamente elevado (6,8) observado en los estudios de fermentación, frente al pH final (6,0) observado en estudios previos (C. Millard *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 62, 1808-1810 (1996)).

Debido a que la introducción de piruvato carboxilasa en *E. coli* tuvo tanto éxito dirigiendo más carbono hacia la rama del succinato, también hubo interés por determinar si se podría dirigir carbono adicional hacia succinato eliminando lactato deshidrogenasa, puesto que esta enzima también compite por piruvato. La Tabla 4 compara los resultados de las fermentaciones usando la cepa RE02 (*ldh*⁻) con o sin el plásmido pTrc99A-*pyc*. Comparada con la cepa de tipo natural (MG1655), la cepa RE02 no mostró cambio significativo en la producción de succinato. En su lugar, las fermentaciones con la cepa RE02, ya sea que contenían el plásmido pTrc99A-*pyc* o no, dieron como resultado una producción incrementada de formiato, acetato y etanol, acompañada por secreción de piruvato. El hecho de que se segregó piruvato en el caldo de fermentación indica que la velocidad de glucólisis fue mayor que la velocidad de utilización del piruvato. El incremento observado en las concentraciones de formiato en el mutante *ldh*⁻ puede estar provocado por la acumulación de piruvato, un compuesto que se sabe que ejerce un efecto alostérico positivo sobre la piruvato formiato liasa (G. Sawers *et al.*, J. Bacteriol., 170, 5330-5336 (1988)). Con RE02, la inducción de piruvato carboxilasa incrementó la producción de succinato 1,7 veces, desde 1,73 g/l en la cepa de control hasta 2,92 g/l. De este modo, el incremento de succinato obtenido en las cepas mutantes *ldh*⁻ fue significativamente menor que el obtenido en la cepa de tipo natural (MG1655). Una posible explicación para esta observación puede ser que la actividad de piruvato carboxilasa fue inhibida por un compuesto celular que se acumuló en los mutantes *ldh*⁻.

Durante la glucólisis se generan dos moles de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH) por mol de glucosa. El NADH se oxida entonces durante la formación de etanol, lactato y succinato en condiciones anaerobias. La incapacidad de los mutantes *ldh*⁻ para consumir NADH a través de la formación de lactato puede enfatizar la capacidad oxidante de estas cepas, conduciendo a una acumulación de NADH. De hecho, se ha mostrado previamente que este cofactor reducido inhibe una piruvato carboxilasa asociada con *Saccharomyces cerevisiae* (J. Cazzulo *et al.*, Biochem. J., 112, 755-762 (1969)). A fin de elucidar si tal estrés oxidante puede ser la causa del beneficio atenuado que se observó cuando la piruvato carboxilasa se expresó en los mutantes *ldh*⁻, se investigó el efecto de dinucleótido de nicotinamida adenina tanto oxidado como reducido (NADH/NAD⁺) y de fosfato de dinucleótido (NADPH/NADP⁺) sobre la actividad de piruvato carboxilasa. Se llevaron a cabo ensayos enzimáticos con extracto bruto libre de células obtenido de MG1655 pTrc99A-*pyc*. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, y los valores medios se muestran en la Fig. 9. La desviación estándar no fue mayor de 5% para todos los puntos de datos. NADH inhibió piruvato carboxilasa, mientras que NAD⁺, NADP⁺ y NADPH no lo hicieron. Por lo tanto se teoriza de que el menor potenciamiento del succinato con el mutante *ldh*⁻ de RE02 resulta de una acumulación de NADH intracelular, un cofactor que parece que inhibe la actividad de piruvato carboxilasa.

Ejemplo III

La Expresión de Piruvato Carboxilasa de R. etli no Afecta la Captación de Glucosa en E. coli en Fermentación Anaerobia

Métodos

Microorganismos y plásmidos. Cepa MG1655 de *E. coli* (tipo natural F⁻ λ⁻; M. Guyer *et al.*, Quant. Biol., Cold Spring Harbor Symp., 45, 135-140 (1980); véase también el Ejemplo I) y el plásmido pUC18-*pyc* que contiene el gen *pyc* de *R. etli* (véase el Ejemplo I).

Medios y fermentación. Todas las fermentaciones de 2,0 l se llevaron a cabo en fermentadores de laboratorio de 2,5 l New Brunswick BioFlo III (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) en Luria-Bertani (LB) suplementado con glucosa, 10 g/l; Na₂PHO₄·7H₂O, 3 g/l; KH₂PO₄, 1,5 g/l; NH₄Cl, 1 g/l; MgSO₄·7H₂O, 0,25 g/l; y CaCl₂·2H₂O, 0,02 g/l. Los fermentadores se inocularon con 50 ml de cultivo que se hizo crecer anaeróbicamente. Los fermentadores se hicieron funcionar a 150 rpm, 0% de saturación de oxígeno (sensor de oxígeno polarográfico Ingold, New Brunswick Scientific, Edison, NJ), 37°C, y pH 6,4, que se controló con 10% de NaOH. Las condiciones anaerobias se mantuvieron inundando el espacio superior del fermentador con dióxido de carbono libre de oxígeno. Cuando fue necesario, el medio se suplementó con una concentración inicial de 100 µg/l de ampicilina, que se mostró previamente que era suficiente para mantener la presión selectiva (Ejemplo I).

ES 2 356 335 T3

Métodos analíticos. El crecimiento celular se monitorizó midiendo la densidad óptica (DO) (espectrofotómetro DU-650, Beckman Instruments, San José, CA) a 600 nm. Esta densidad óptica se correlacionó con la masa celular seca usando una curva de calibración de masa celular seca ($g/l = 0,48 \times DO$). La glucosa y los productos de fermentación se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta presión usando una columna de exclusión iónica Coregel 64-H (Interactive Chromatography, San José, CA) como se describe en el Ejemplo II.

La actividad de piruvato carboxilasa y la actividad endógena de PEP carboxilasa se midió haciendo crecer cada cepa y clon separadamente en botellas de suero de 160 ml en condiciones anaerobias estrictas. Los cultivos se cosecharon en crecimiento semilogarítmico, se lavaron y se sometieron a destrucción celular mediante ultrasonidos. Los desechos celulares se eliminaron mediante centrifugación ($20000 \times g$ durante 15 min. a $4^{\circ}C$). La actividad de piruvato carboxilasa se midió como se describe previamente (Payne y Morris, 1969), y la actividad de PEP carboxilasa se midió en ausencia de ATP usando PEP en lugar de piruvato como sustrato, monitorizándose la aparición de la formación de tionitrobenzoato dependiente de CoA a 412 nm. La proteína total en el extracto celular se determinó usando el método de Lowry.

Resultados

MG1655 de *E. coli* creció anaeróticamente con 10 g/l de glucosa como energía y fuente de carbono para producir los productos finales mostrados en la Fig. 2. La participación de fosfoenolpiruvato en la captación de glucosa se muestra mediante la línea discontinua. La ruta bioquímica no es estequiométrica, ni se muestran todos los cofactores. La Fig. 10 muestra las concentraciones de masa celular seca, de succinato, lactato, formiato y glucosa con el tiempo en una fermentación de 2 litros típica de esta cepa de tipo natural. La Fig. 11 muestra estas concentraciones con el tiempo en una fermentación de esta cepa de tipo natural con el vector de clonación/expresión pUC18. Después de la utilización completa de la glucosa, la concentración media final de succinato para la cepa de tipo natural fue 1,18 g/l, mientras que para la cepa de tipo natural con el vector pUC18 la concentración final de succinato fue 1,00 g/l. Para estas fermentaciones, la concentración media final de lactato fue 2,33 g/l para la cepa de tipo natural, y 2,27 g/l para la misma cepa con pUC18.

La Fig. 12 muestra las concentraciones con el tiempo de masa celular seca, succinato, lactato, formiato y glucosa en una fermentación de la cepa que contiene el plásmido pUC18-*pyc*. Esta figura muestra que la expresión de piruvato carboxilasa provoca un incremento sustancial en la concentración final de succinato, y una disminución de la concentración de lactato. Específicamente, para el tipo natural con pUC18-*pyc*, la concentración media final de succinato fue 1,77 g/l, mientras que la concentración media final de lactato fue 1,88 g/l. Estas concentraciones corresponden a un incremento del 50% en succinato, y alrededor de un incremento del 20% en la concentración de lactato, indicando que el carbono se desvió desde el lactato hacia la formación de succinato en presencia de la piruvato carboxilasa.

Las actividades de PEP carboxilasa y piruvato carboxilasa se ensayaron en extractos libres de células de las cepas de tipo natural y las que contienen el plásmido, y estos resultados se muestran en la Tabla 5. En la cepa de tipo natural y en la cepa que tiene el vector, no se detectó actividad de piruvato carboxilasa, mientras que esta actividad se detectó en el clon MG1655/pUC18-*pyc*. La actividad de PEP carboxilasa se observó en las tres cepas.

TABLA 5

Actividad enzimática en cultivo de crecimiento semilogarítmico

Cepa	Actividad esp. ($\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína)	
	Piruvato carboxilasa	PEP carboxilasa
MG1655	0,0	0,10
MG1655/pUC18	0,0	0,12
MG1655/pUC18- <i>pyc</i>	0,06	0,08

Para determinar las velocidades de consumo de glucosa, producción de succinato, y producción de masa celular durante las fermentaciones, cada conjunto de datos de concentración se ajustó a un polinomio de quinto orden. (Estas curvas de mejor ajuste se muestran en las Figs. 10-12 con las concentraciones medidas). Tomando la primera derivada de esta función con respecto al tiempo, resulta una ecuación que proporciona estas velocidades como funciones del tiempo. Este procedimiento es análogo a métodos previos (E. Papoutsakis *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 56-66 (1985); K. Reardon *et al.*, *Biotechnol. Prog.*, 3, 153-167 (1987)) usados para calcular flujos metabólicos. En el caso de fermentaciones tanto con piruvato carboxilasa como con PEP carboxilasa presentes, sin embargo, el análisis del flujo no se pudo completar debido a una singularidad matemática en los nodos de PEP/piruvato (S. Park *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 864-879 (1997)). No obstante, usando este enfoque, se puede determinar la captación de glucosa y las velocidades de producción de succinato y de masa celular.

ES 2 356 335 T3

La Tabla 6 muestra los resultados de calcular las velocidades de captación de glucosa, y de producción de succinato y de masa celular en una cepa de *E. coli* de tipo natural (MG1655), la cepa de tipo natural con el vector de clonación/expresión pUC18 (MG1655/pUC18) y la cepa de tipo natural con MG1655/pUC18-*pyc*. Todas las unidades están en g/l.h, y los valores entre paréntesis representan la desviación estándar de las medidas.

TABLA 6

Velocidades de captación de glucosa, producción de succinato, y producción celular

Parámetro	MG1655	MG1655/pUC18	MG1655/pUC18- <i>pyc</i>
Captación de glucosa (máxima)	2,17 (0,10)	2,40 (0,01)	2,47 (0,01)
Captación de glucosa (promedio durante 4 h finales de las fermentaciones)	1,99 (0,05)	2,00 (0,06)	1,99 (0,05)
Velocidad de producción de succinato (en el momento de captación máxima de glucosa)	0,234 (0,010)	0,200 (0,012)	0,426 (0,015)
Velocidad de producción de succinato (promedio durante 4 h finales)	0,207 (0,005)	0,177 (0,009)	0,347 (0,002)
Producción celular (máxima)	0,213 (0,006)	0,169 (0,033)	0,199 (0,000)

Como demuestran estos resultados, la adición del vector de clonación o el vector con el gen *pyc* no tuvo ningún efecto significativo sobre la captación media de glucosa durante las 4 horas finales de las fermentaciones. De hecho, la presencia del gen *pyc* aumentó realmente la captación máxima de glucosa alrededor de 14% desde 2,17 g/l.h hasta 2,47 g/l.h. La presencia del vector de clonación pUC18 redujo ligeramente las velocidades de producción de succinato. Como se esperaba de los datos mostrados en la Fig. 12, la expresión del gen *pyc* dio como resultado un incremento del 82% en la producción de succinato en el momento de captación máxima de glucosa, y un incremento del 68% en la velocidad de producción de succinato durante las 4 horas finales de las fermentaciones. La velocidad máxima de crecimiento celular (que ocurrió a las 4-5 horas para cada una de las fermentaciones) fue 0,213 g/l.h en la cepa de tipo natural, pero disminuyó en presencia de pUC18 (0,169 g/l.h) o pUC18-*pyc* (0,199 g/l.h). De forma similar, el rendimiento celular global fue 0,0946 g de células secas/g de glucosa consumida para el tipo natural, pero 0,0895 g/g para el tipo natural con pUC18, y 0,0882 g/g para la cepa de tipo natural con pUC18-*pyc*. Esta disminución en la biomasa puede ser debida al gasto de un mol de unidad de energía (ATP) por mol de piruvato convertido en oxaloacetato por piruvato carboxilasa y las demandas incrementadas de síntesis proteica en las cepas que contienen el plásmido. La velocidad específica de crecimiento celular no se pudo calcular, puesto que el crecimiento de esta cepa muestra un crecimiento logarítmico sólo durante las primeras pocas horas de crecimiento.

En resumen, la expresión de piruvato carboxilasa procedente de *R. etli* en *E. coli* provoca un incremento significativo en la producción de succinato a expensas de la producción de lactato sin afectar a la captación de glucosa. Este resultado tiene tremendas ramificaciones para procesos de fermentación bacteriana que se usan para producir productos bioquímicos derivados de oxaloacetato. Debido a que la sobreexpresión de piruvato carboxilasa provoca una producción incrementada de productos bioquímicos derivados de oxaloacetato sin afectar a la captación de glucosa, esta tecnología se puede emplear ventajosamente en procesos de fermentación a fin de obtener más producto por cantidad de glucosa aportada.

ES 2 356 335 T3

Ejemplo IV

La Expresión de Piruvato Carboxilasa de R. etli Provoca Producción Incrementada de Treonina en E. coli

5 *Materiales y métodos*

Cepas bacterianas y plásmidos. Se usó en este estudio la cepa β IM-4 productora de treonina (ATCC 21277) (Shiio y Nakamori, Agr. Biol. Chem., 33, 1152-1160 (1969); I. Shiio *et al.* patente U.S. n° 3.580.810 (1971)). Esta cepa se transformó con pTrc99A-*pyc* (véase el Ejemplo II) o pTrc99A (E. Amann *et al.*, Gene, 69, 301-315 (1988)).

10

Medios y condiciones de crecimiento. Se llevaron a cabo fermentaciones aerobias en un volumen de 2,0 l en fermentadores Bioflow II. Los medios usados para estas fermentaciones contenían (por litro): glucosa, 30,0 g; (NH₄)₂SO₄ 10,0 g, FeSO₄·H₂O, 10,0 mg; MnSO₄·H₂O, 5,5 mg/l; L-prolina, 300 mg; L-isoleucina, 100 mg; L-metionina, 100 mg; MgSO₄·7H₂O, 1 g; KH₂PO₄, 1 g; CaCO₃, 20 g; tiamina·HCl, 1 mg; d-biotina, 1 mg. A fin de mantener presión selectiva para las cepas que tienen el plásmido, los medios se suplementaron inicialmente con 50 mg/l de ampicilina. También, se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mmol/l a 2 horas a las fermentaciones realizadas con cualquiera de estas cepas.

15

Análisis de los productos de fermentación. El crecimiento celular se determinó midiendo la densidad óptica a 550 nm de una dilución 1:21 de muestra en HCl 0,1 M. La glucosa, el ácido acético y otros ácidos orgánicos se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta presión como se describe previamente (Eiteman y Chastain, Anal. Chim. Acta, 338, 69-75 (1997)) usando una columna de exclusión iónica Coregel 64-H. La treonina se cuantificó mediante cromatografía de líquidos de alta presión usando el método de derivatización de orto-ftaldialdehído (D. Hill, *et al.*, Anal. Chem., 51, 1338-1341 (1979); V. Svedas, *et al.* Anal. Biochem., 101, 188-195 (1980)).

25

Resultados

La cepa β IM-4 productora de treonina (ATCC 21277), que posee el plásmido de control pTrc99A o el plásmido pTrc99A-*pyc* que sobreproduce piruvato carboxilasa, se hizo crecer aeróbicamente con 30 g/l de glucosa como energía y fuente de carbono, y se midió la producción de treonina. Como se muestra en la Fig. 13, la sobreproducción de piruvato carboxilasa provocó un incremento significativo en la producción de treonina en la cepa de *E. coli* productora de treonina. A las 17 horas cuando se consumió la glucosa agregada inicial, se detectó una concentración de 0,57 g/l de treonina en la cepa progenitora que contiene el plásmido de control pTrc99A, mientras que se detectó una concentración de 1,37 g/l en la cepa progenitora que contiene el plásmido pTrc99A-*pyc*. Dado que la DO₅₅₀ final de ambos cultivos está dentro de 10% entre sí al final de la fermentación, el incremento del 240% en la concentración de treonina provocado por la sobreproducción de piruvato carboxilasa se puede considerar como significativo. Como en los estudios de fermentación aerobia (véase el Ejemplo III), se encontró que la captación de glucosa no se vio adversamente afectada por la sobreproducción de piruvato carboxilasa.

40

Ejemplo V de Referencia

Síntesis Potenciada de Lisina Mediante C. glutamicum

45

C. glutamicum ha sido desde hace mucho el microorganismo preferido para la producción enzimática de lisina en la industria de productos bioquímicos. Las cepas de origen natural de *C. glutamicum* fabrican más aminoácidos derivados de oxaloacetato que muchos otros microbios conocidos. Véase Kirk *et al.*, Encyclopedia of Chemical Technology, 4^a Ed., Vol. 2, p. 534-570 (1992). Las cepas que se usan comercialmente para obtener lisina son típicamente aquellas en las que se han eliminado todas las ramas biosintéticas después del oxaloacetato que fabrican cualquier aminoácido distinto de lisina, maximizando así la biosíntesis de lisina. La enzima piruvato carboxilasa se ha encontrado solo recientemente en *C. glutamicum*, y no parece que es expresada de forma elevada cuando *C. glutamicum* se hace crecer en medios que usan glucosa como la fuente de carbono (P. Peters-Wendisch *et al.*, Microbiology (Reading), 143, 1095-1103 (1997); M. Koffas *et al.*, número de presentación GenBank AF038548 (presentado el 14 de diciembre de 1997). Aunque contiene su propia piruvato carboxilasa endógena, una manera más conveniente para sobreexpresar esta enzima en *C. glutamicum* es insertar el gen extraño *pyc* procedente de *R. etli*. En consecuencia, el constructo actual procedente de pUC18 como se describe en los Ejemplos I y II se transferirá a *C. glutamicum* usando el vector lanzadera pEXO (G. Eikmanns *et al.*, Gene, 102, 93098 (1991)). La sobreexpresión de piruvato carboxilasa en *Corynebacterium glutamicum* también se puede lograr usando el gen que codifica piruvato carboxilasa procedente de *P. fluorescens*. Se espera que el carbono se desvíe hacia lisina en una fermentación aerobia e incremente el rendimiento de lisina.

60

Ejemplo VI de Referencia

65 *Síntesis Potenciada de Lisina Mediante Auxótrofos de C. glutamicum*

Pruebas recientes demuestran que acetato, valina y alanina se acumulan cada uno en las últimas etapas de la síntesis de lisina en *C. glutamicum* (J. Vallino *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 41, 633-646 (1993)). Puesto que cada uno

de estos productos deriva directamente de piruvato, esta observación sugiere que existe un cuello de botella en la ruta en el piruvato (véase Fig. 1). *C. glutamicum*, que se ha manipulado mediante ingeniería según la invención para sobreexpresar piruvato carboxilasa, ya tiene un medio adicional para consumir piruvato, e incluso se puede desviar más carbono hacia lisina si se bloquea una o más de estas rutas. Los auxótrofos para la alanina y la valina y los mutantes para el acetato de *C. glutamicum* se pueden manipular mediante ingeniería para sobreexpresar piruvato carboxilasa según la invención, para potenciar adicionalmente el rendimiento de lisina.

Ejemplo VII de Referencia

Síntesis Potenciada de Treonina en C. glutamicum

C. glutamicum también se puede usar para producir treonina; sin embargo, las cepas que se usan para las síntesis de treonina son diferentes de las cepas que se usan para la síntesis de lisina. En las cepas productoras de treonina, todas las ramas biosintéticas después del oxaloacetato que fabrican cualquier aminoácido distinto de treonina se han eliminado, maximizando así la biosíntesis de treonina. Puesto que la diferencia entre las cepas productoras de lisina y las cepas productoras de treonina se produce después del nodo del oxaloacetato, la tecnología de manipulación metabólica mediante ingeniería de la invención se puede aplicar igualmente a las cepas productoras de treonina de *C. glutamicum* para potenciar la síntesis de treonina. La síntesis de treonina está potenciada además en un auxótrofo de *C. glutamicum* como se describe anteriormente en el Ejemplo VI, que se refiere a la síntesis de lisina en *C. glutamicum*.

Ejemplo VIII

Potenciación de la Producción Bioquímica Usando Piruvato Carboxilasa de P. fluorescens

Una de las razones principales por las que la red metabólica responsable de regular los niveles intracelulares de oxaloacetato está tan fuertemente controlada es debida al hecho de que las enzimas claves que están implicadas en este proceso están reguladas tanto positiva como negativamente. En la mayoría de los organismos tales como *R. etli*, la piruvato carboxilasa requiere la molécula efectora positiva acetil coenzima A para su activación, y es reprimida debido a retroinhibición por aspartato (P. Atwood, Intl. J. Biochem. Cell Biol., 27, 231-249 (1995); M. Dunn *et al.*, J. Bacteriol., 178, 5960-5970 (1996)). Los beneficios obtenidos de la sobreproducción de piruvato carboxilasa de *R. etli* están limitados así por el hecho de que la desviación de carbono desde piruvato hacia oxaloacetato agota los niveles de acetil coenzima A e incrementa los niveles de aspartato. La piruvato carboxilasa de *P. fluorescens*, sin embargo, no requiere acetil coenzima A para su activación, y no se ve afectada por la retroinhibición provocada por aspartato (R. Silvia *et al.*, J. Gen. Microbiol., 93, 75-81 (1976)). La piruvato carboxilasa de *P. fluorescens* sobreproducida debería permitir que se desviase incluso más flujo de carbono hacia oxaloacetato.

Debido a que los genes que codifican piruvato carboxilasas en bacterias parecen ser muy homólogos, el gen *pyc* de *P. fluorescens* se puede aislar fácilmente a partir de una genoteca usando sondas que se han preparado a partir del gen de *R. etli*. De este modo, el gen para piruvato carboxilasa en *P. fluorescens* se identificará, aislará y clonará en un vector de expresión usando técnicas de ingeniería genética estándar. Como alternativa, la enzima piruvato carboxilasa se puede aislar y purificar a partir de *P. fluorescens* siguiendo la actividad de piruvato carboxilasa (como se describe en los Ejemplos anteriores) y también evaluando la proteína biotinilada usando transferencias Western. La secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína purificada se determina, y después se obtiene una sonda oligonucleotídica degenerada que se usa para aislar el gen que codifica piruvato carboxilasa a partir de una genoteca que se ha preparado a partir de *P. fluorescens*. El clon de *pyc* así obtenido se secuencía. A partir de los datos de secuencia, se diseñan cebadores oligonucleotídicos que permiten clonar este gen en un vector de expresión de forma que la piruvato carboxilasa se puede sobreproducir en la célula hospedante. Cualquier método se puede usar para producir un vector que codifica el gen *pyc* de *P. fluorescens*, que entonces se usa para transformar la célula hospedante de *E. coli* o *C. glutamicum*. La piruvato carboxilasa procedente de *P. fluorescens* se expresa en la célula hospedante, y la producción bioquímica se potencia como se describe en los ejemplos anteriores.

Ejemplo IX de Referencia

Potenciación de la Producción Bioquímica Mediante Sobreexpresión de Tanto Piruvato Carboxilasa Como PEP Carboxilasa

En muchos organismos, PEP se puede carboxilar a oxaloacetato vía PEP carboxilasa, o se puede convertir en piruvato mediante piruvato cinasa (I. Shiiro *et al.*, J. Biochem., 48, 110-120 (1960); M. Jetten *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 41, 47-52 (1994)). Una posible estrategia que se intentó para incrementar el flujo de carbono hacia oxaloacetato en *C. glutamicum* fue bloquear el flujo de carbono desde PEP hacia piruvato (véase la Fig. 3). Sin embargo, la producción de lisina mediante mutantes de piruvato cinasa fue 40% menor que mediante una cepa progenitora, indicando que piruvato es esencial para la producción de lisina a gran nivel (M. Gubler *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 60, 47-52 (1994)).

ES 2 356 335 T3

El flujo de carbono hacia oxaloacetato se puede incrementar sobreexpresando PEP carboxilasa conjuntamente con piruvato carboxilasa sobreexpresada, sin bloquear concomitantemente el flujo de carbono desde PEP hacia piruvato, o afectar la captación de glucosa.

5 En heterótrofos tales como *C. glutamicum*, sin embargo, la PEP carboxilasa requiere acetil-CoA para su activación, y es inhibida por aspartato (S. Mike *et al.*, Annals NY Acad. Sci., 272, 12-29 (1993)); por tanto, la amplificación de genes de PEP carboxilasa de *C. glutamicum* no ha dado como resultado un aumento del rendimiento de lisina (J. Kremer *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 57, 1746-1752 (1991)). La PEP carboxilasa aislada de la cianobacteria *Anacystis nidulans*, sin embargo, no requiere acetil CoA para su activación, ni es inhibida por aspartato (M. Utter *et al.*, Enzymes, 6, 117-135 (1972)). Por lo tanto, esta enzima heteróloga se puede usar para incrementar el flujo de carbono hacia oxaloacetato en *C. glutamicum*. Estos genes que codifican PEP carboxilasa en *A. nidulans* se han aislado y clonado (T. Kodaki *et al.*, J. Biochem., 97, 533-539 (1985)).

15 Ejemplo X

Potenciación de la Producción Bioquímica Destruyendo el Gen pck que Codifica PEP Carboxicinasa Conjuntamente con Piruvato Carboxilasa Sobreexpresada

20 Algo del carbono que se desvía hacia oxaloacetato vía piruvato carboxilasa sobreproducida se convierte probablemente de nuevo en PEP debido a la presencia de PEP carboxicinasa. Se puede desviar más carbono hacia oxaloacetato en estos sistemas si la célula hospedante contiene un gen *pck* interrumpido, tal como una cepa de *E. coli* que contiene un alelo nulo de *pck* (por ejemplo, A. Goldie, J. Bacteriol., 141, 115-1121 (1980)).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería para la producción aumentada de productos bioquímicos derivados de oxaloacetato, en la que dicha célula expresa una piruvato carboxilasa, en la que dicha célula antes de la manipulación mediante ingeniería carece de una piruvato carboxilasa endógena, con la condición de que dicha célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería no sea una célula de *Escherichia coli*.
- 10 2. La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la reivindicación 1, que es una célula bacteriana.
3. La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de cualquier reivindicación anterior, que es un auxótrofo para la alanina, un auxótrofo para la valina, un mutante para el acetato, o cualquier combinación de los mismos.
- 15 4. La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de cualquier reivindicación anterior, que expresa una piruvato carboxilasa derivada de *Rhizobium etli*.
5. La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la reivindicación 4, que se ha transformado con un gen *pyc* de *R. etli*.
- 20 6. La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de cualquier reivindicación anterior, que expresa una piruvato carboxilasa derivada de *Pseudomonas fluorescens*.
7. La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la reivindicación 6, que se ha transformado con un gen *pyc* de *P. fluorescens*.
- 25 8. La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de cualquier reivindicación anterior, que comprende además PEP carboxilasa, en la que la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería sobreexpresa PEP carboxilasa.
- 30 9. La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la reivindicación 8, que expresa PEP carboxilasa derivada de *Anacystis nidulans*.
10. La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de cualquier reivindicación anterior, que comprende además PEP carboxilasa, en la que la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería expresa PEP carboxicinasa a un nivel menor que el nivel de PEP carboxicinasa expresado en la célula de tipo natural correspondiente.
- 35 11. La célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería de la reivindicación 10, que no expresa un nivel detectable de PEP carboxicinasa.
- 40 12. Un método para obtener una célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería para la producción aumentada de productos bioquímicos derivados de oxaloacetato, en el que dicha célula expresa una piruvato carboxilasa, comprendiendo el método transformar una célula con un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que tiene actividad de piruvato carboxilasa para producir una célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería que expresa una piruvato carboxilasa, en el que dicha célula antes de la transformación carece de una piruvato carboxilasa endógena, con la condición de que dicha célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería no sea una célula de *Escherichia coli*.
- 45 13. El método de la reivindicación 12, que comprende además transformar la célula con un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica PEP carboxilasa, tal como la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería que sobreexpresa PEP carboxilasa.
- 50 14. El método de la reivindicación 12, en el que la célula manipulada metabólicamente mediante ingeniería no expresa un nivel detectable de PEP carboxicinasa.
- 55 15. Un método para obtener un producto bioquímico derivado de oxaloacetato, que comprende:
- 60 a) proporcionar una célula que produce el producto bioquímico;
- b) transformar la célula con un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que tiene actividad de piruvato carboxilasa, en el que dicha célula antes de la transformación carece de una piruvato carboxilasa endógena;
- 65 c) expresar la enzima en la célula para provocar la producción aumentada del producto bioquímico; y
- d) aislar el producto bioquímico.

ES 2 356 335 T3

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que dicha célula es una célula bacteriana.

17. El método de la reivindicación 15, en el que dicha célula es una célula de *Escherichia coli*.

5 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en el que el fragmento de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en un gen de *R. etli* que codifica piruvato carboxilasa, y un gen de *P. fluorescens* que codifica piruvato carboxilasa.

10 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en el que dicha célula es un auxótrofo para la alanina, un auxótrofo para la valina, un mutante para el acetato, o cualquier combinación de los mismos.

20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en el que el producto bioquímico se produce en condiciones aerobias.

15 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en el que el producto bioquímico se produce en condiciones anaerobias.

20 22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, en el que el producto bioquímico derivado de oxaloacetato se selecciona del grupo que consiste en un ácido orgánico, un aminoácido, una porfirina y un nucleótido de pirimidina.

25 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, en el que el producto bioquímico derivado de oxaloacetato se selecciona del grupo que consiste en arginina, asparagina, aspartato, glutamato, glutamina, metionina, treonina, prolina, isoleucina, lisina, malato, fumarato, succinato, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, formiato y succinil-CoA.

30

35

40

45

50

55

60

65

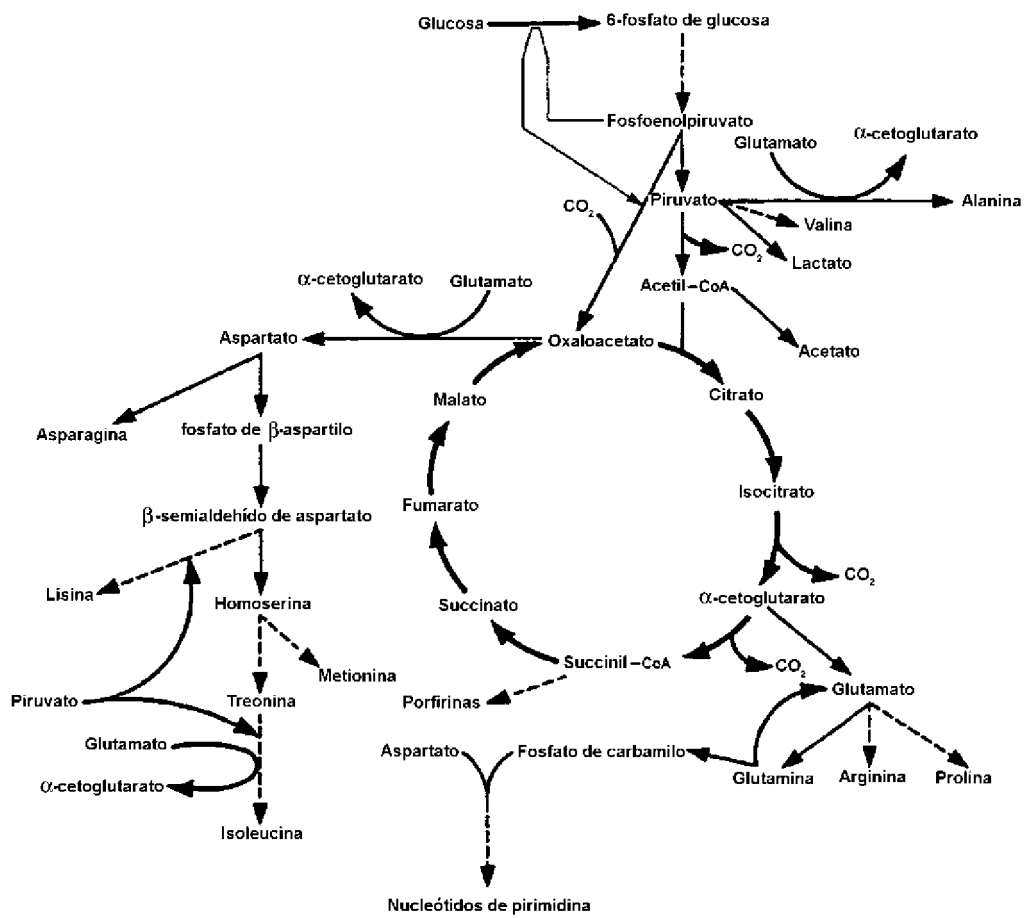


FIG. 1

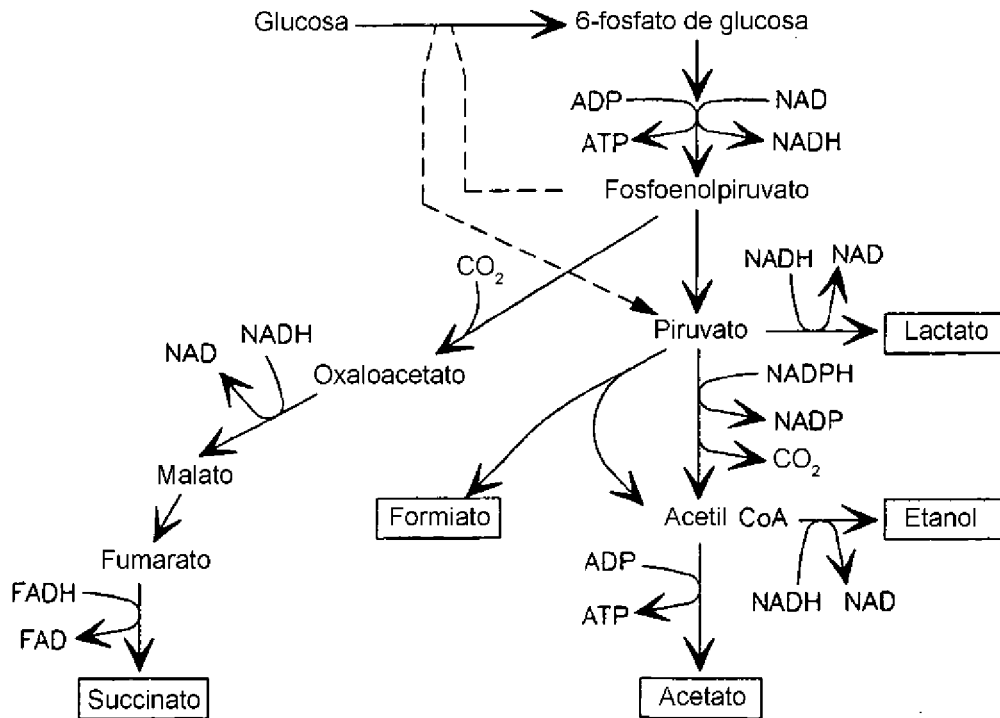


FIG. 2

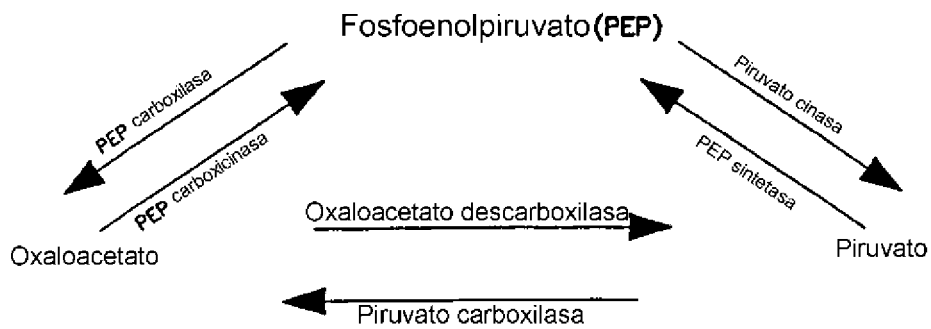


FIG. 3

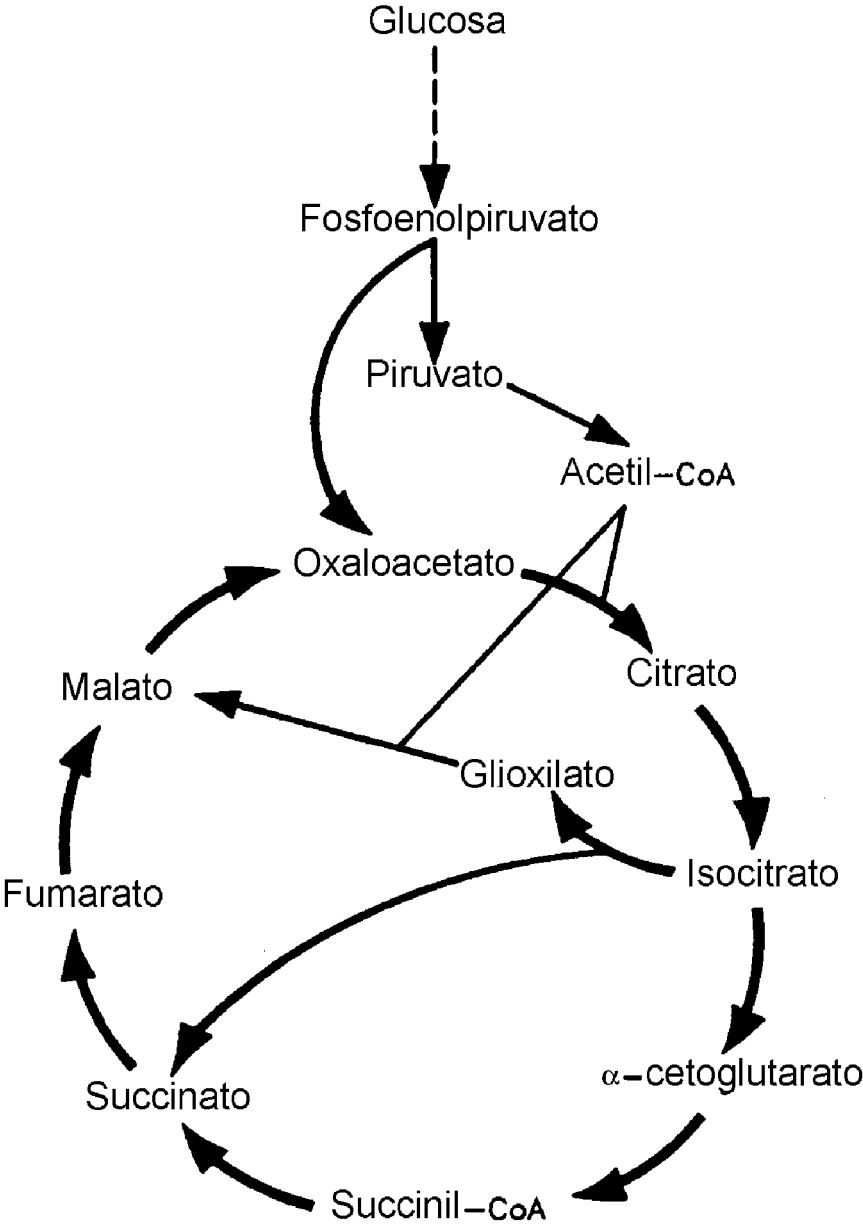
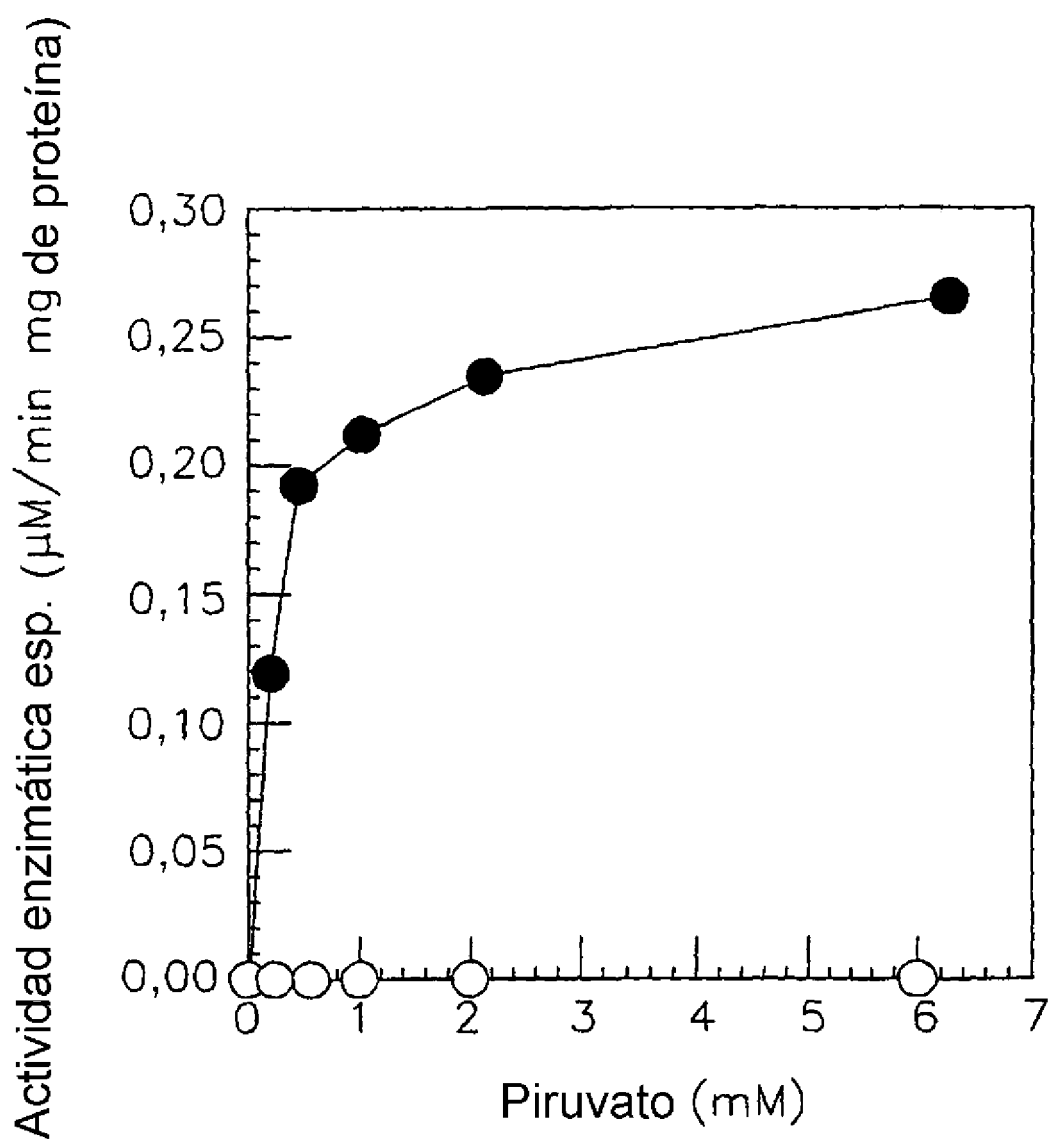


FIG. 4

**FIG. 5**

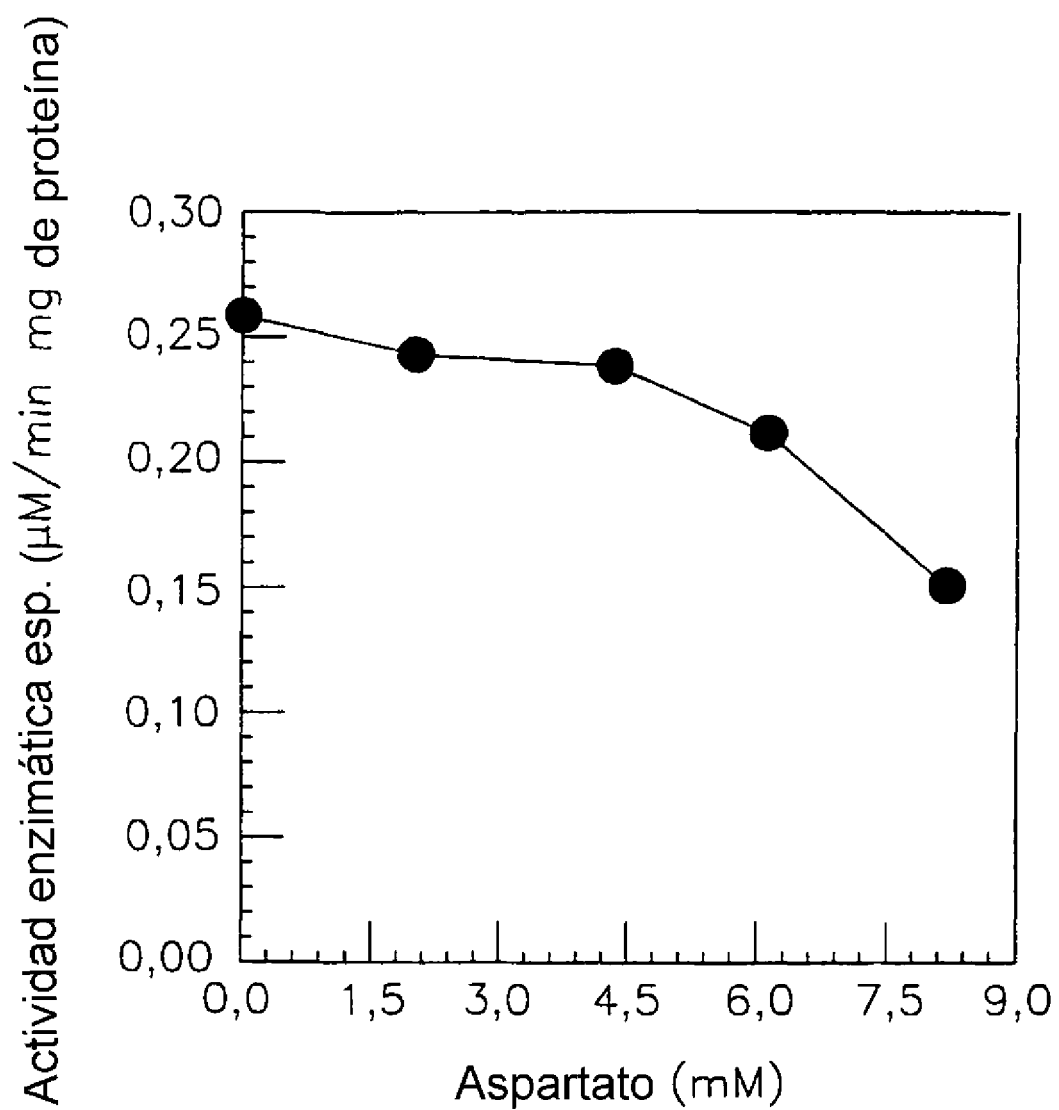


FIG. 6

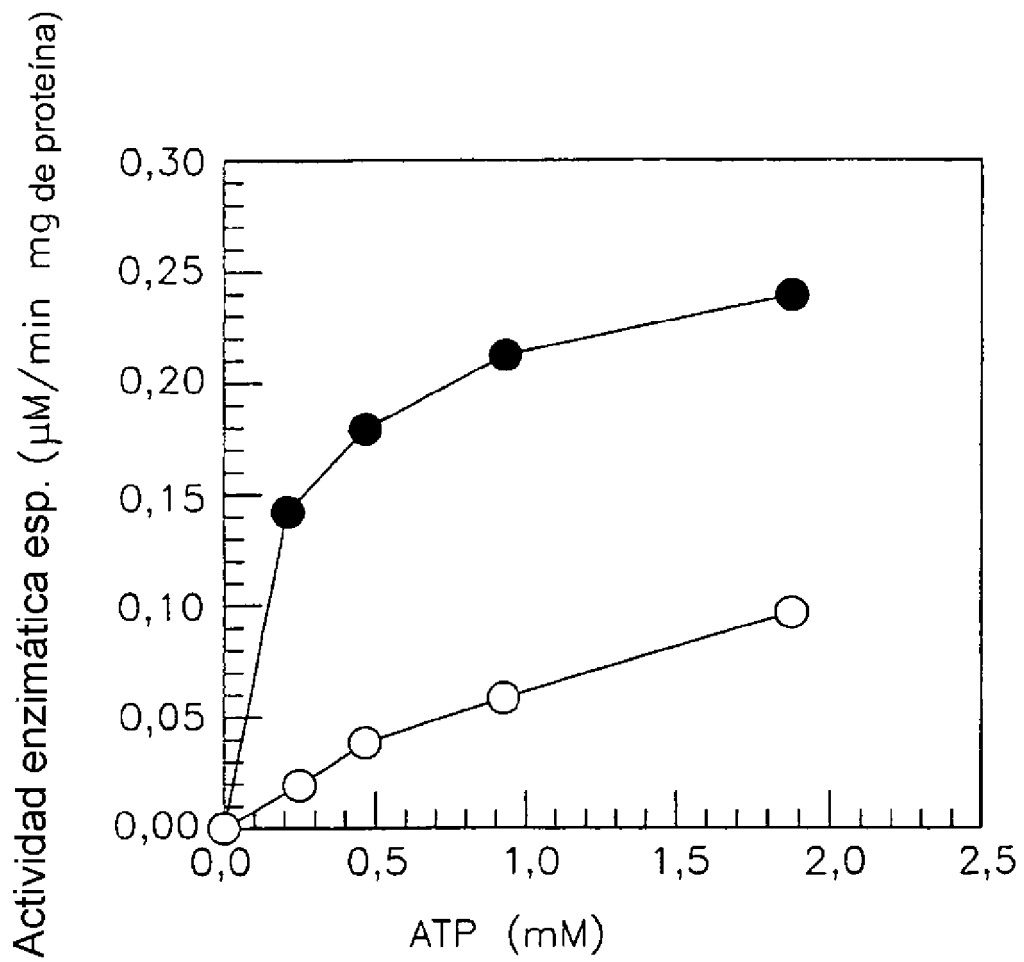


FIG. 7

pUC18

pUC18-pyc



FIG. 8

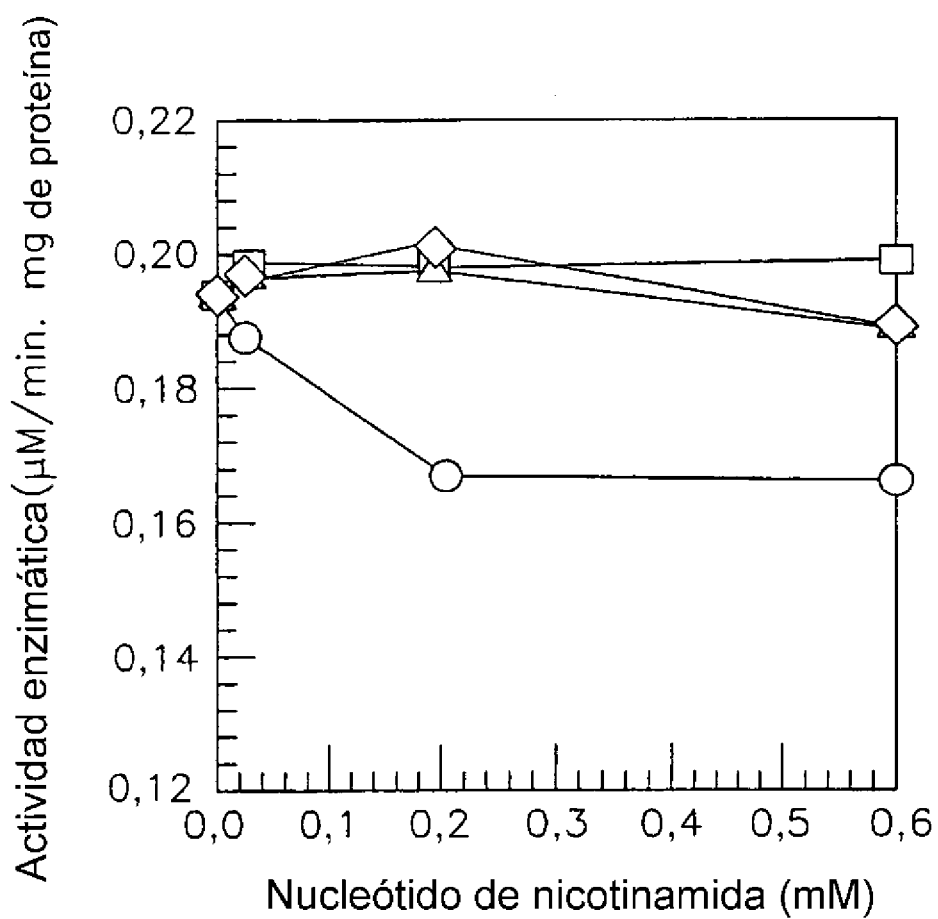


FIG. 9

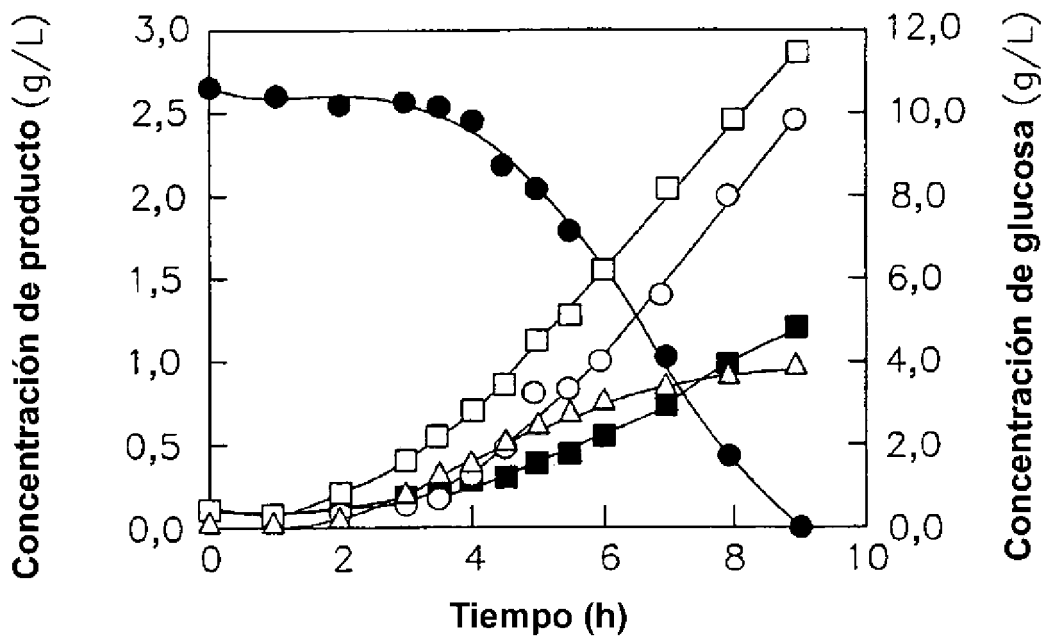


FIG. 10

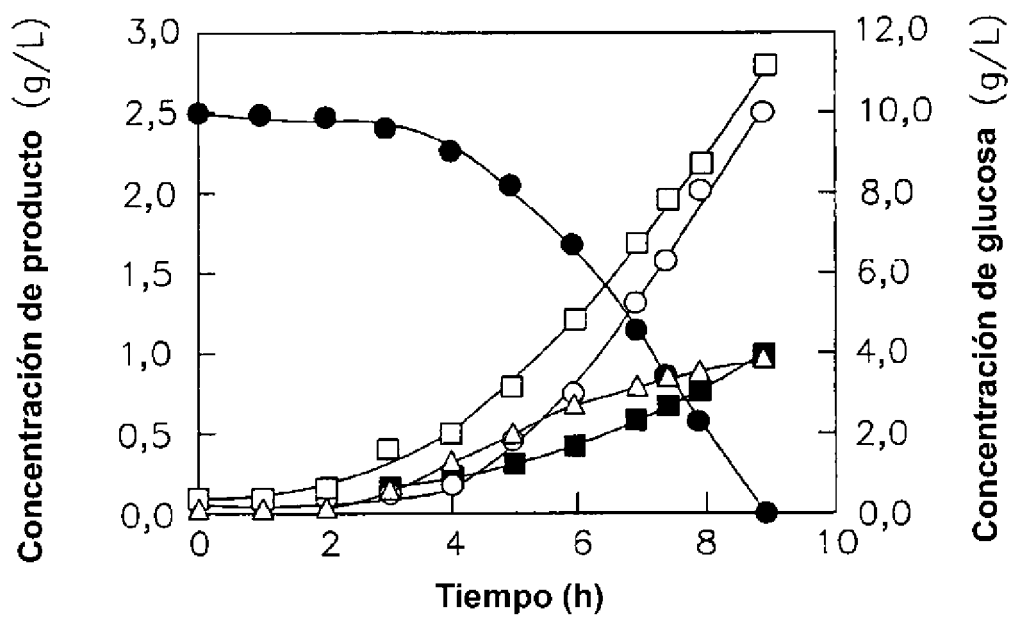


FIG. 11

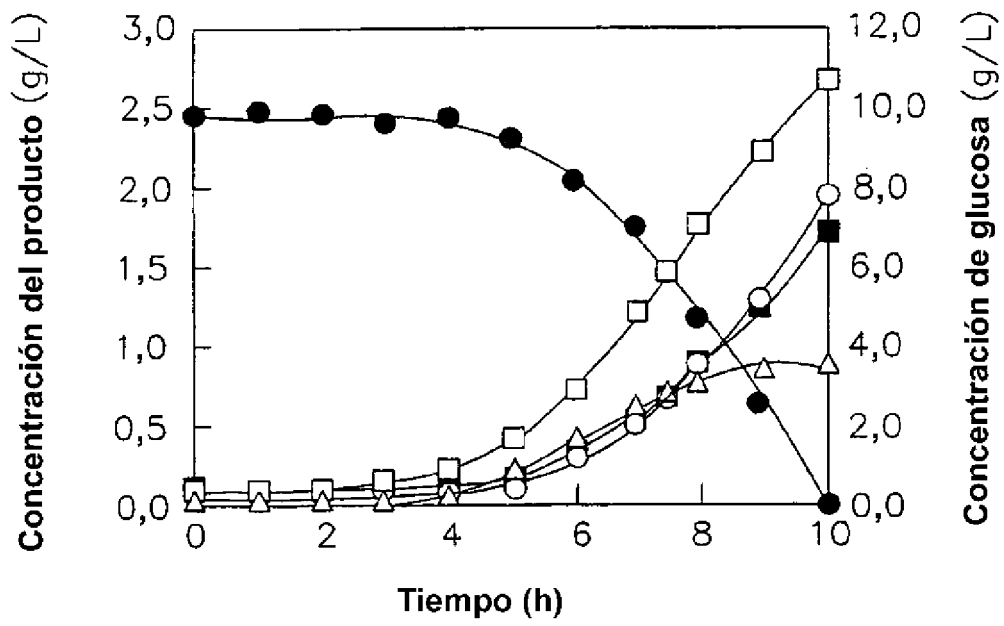


FIG. 12

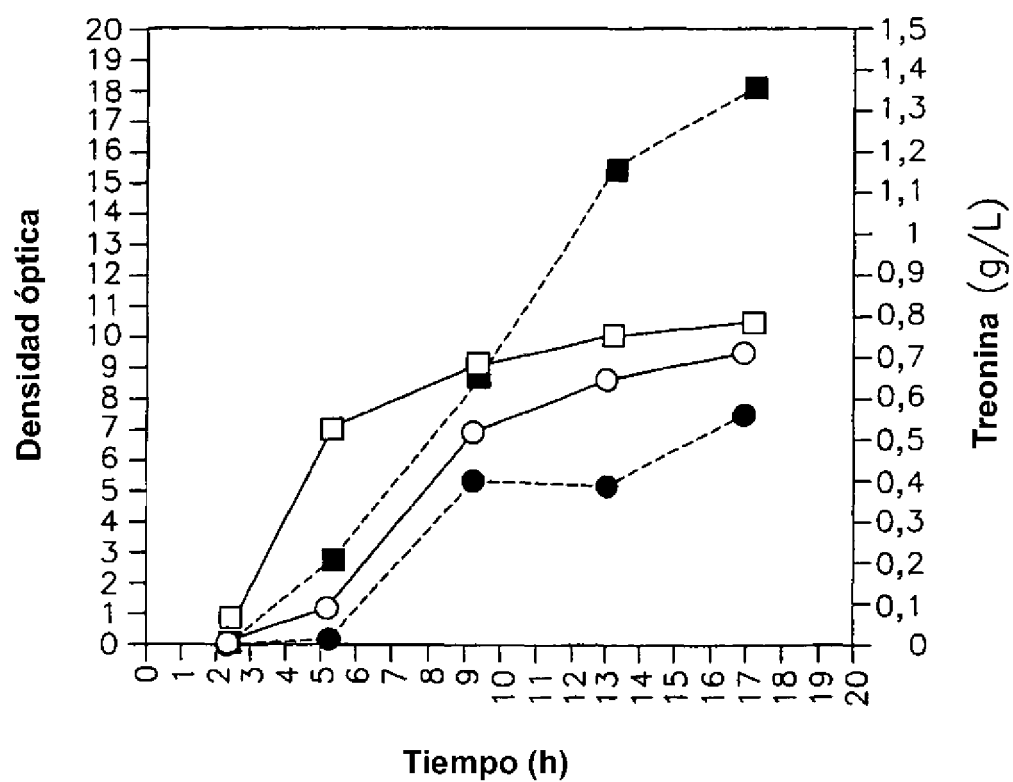


FIG. 13