

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 648**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12P 13/00** (2006.01)

**C12P 7/00** (2006.01)

**C12P 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04805397 .9**

96 Fecha de presentación: **05.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1680504**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

54 Título: **CEPAS DE MICROORGANISMOS OPTIMIZADAS PARA VÍAS DE BIOSÍNTESIS CONSUMIDORAS DE NADPH.**

30 Prioridad:  
**06.11.2003 FR 0313056**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.01.2012**

73 Titular/es:  
**METABOLIC EXPLORER  
BIOPOLE CLERMONT-LIMAGE  
63360 SAINT BEAUZIRE, FR**

72 Inventor/es:  
**BESTEL-CORRE, Gwénaëlle;  
BOISART, Cédric;  
CHATEAU, Michel;  
GONZALEZ, Benjamin;  
SOUCAILLE, Philippe;  
FIGGE, Rainer y  
ZINK, Olivier**

74 Agente: **Jorda Petersen, Santiago**

**ES 2 371 648 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

Cepas de microorganismos optimizadas para vías de biosíntesis consumidoras de NADPH.

- 5 El NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) participa en su forma reducida, NADPH, en las reacciones intracelulares de oxidorreducciones que implican unas enzimas con actividad deshidrogenasa o reductasa.

10 La presente invención se refiere a unas cepas de microorganismos optimizadas para la producción, mediante biotransformación, de moléculas que tienen unas vías de biosíntesis consumidoras de NADPH. Las cepas según la invención se pueden utilizar en unos procedimientos de biotransformación consumidores de NADPH. Las cepas definidas según la invención pueden ser procarióticas o eucarióticas. En un modo de realización preferido, dicha cepa procariótica es una cepa de *Escherichia coli*. En otro modo de realización, dicha cepa eucariótica es una cepa de *Saccharomyces*, en particular *S. cerevisiae*.

15 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de moléculas por biotransformación que comprende el cultivo en un medio apropiado de una cepa optimizada según la invención, comprendiendo asimismo dicha cepa optimizada los elementos genéticos necesarios para la preparación de dicha molécula.

20 Los procedimientos de biotransformación han sido desarrollados para permitir la producción de moléculas en grandes cantidades a bajo coste, permitiendo al mismo tiempo asimismo la valorización de diferentes sub-productos industriales o de la agricultura.

Para producir unas moléculas de interés mediante biotransformación *in vivo* se distinguirán dos grandes enfoques:

- 25 - por un lado la fermentación que permite la producción de moléculas por un microorganismo a partir de una fuente de carbono simple (por ejemplo el documento WO0102547) que describe la producción de lisina por fermentación de *C. glutamicum* en presencia de glucosa),
- 30 - por otra parte, la bioconversión por un microorganismo de un co-sustrato dado en una molécula de interés (véanse por ejemplo el documento WO0012745 que describe la producción de derivados R-piperidina, y el documento WO 0068397 que describe la producción de tagatosa). El co-sustrato es no asimilable; es diferente de la fuente de carbono que se utiliza sólo para producir la biomasa y el NADPH necesario a la bioconversión.

35 La mejora de un procedimiento de biotransformación puede basarse en diferentes factores tales como la temperatura, la oxigenación, la composición del medio, el procedimiento de recuperación, etc. Se puede prever asimismo la modificación del microorganismo de tal manera que la producción de la molécula de interés y/o su excreción sean aumentadas.

40 En el ámbito de una fermentación, se esforzará por ejemplo en optimizar la vía de biosíntesis, por ejemplo modificando la regulación de los genes o modificando los genes con el fin de modificar las características de las enzimas implicadas, o también optimizando la regeneración de los cofactores.

45 En el marco de la bioconversión, se esforzará más en reducir la formación de co-productos y optimizar la regeneración de cofactores implicados en la(s) etapa(s) de bioconversión.

50 Entre los cofactores implicados en las biotransformaciones, el NADPH toma una parte importante, en particular para la producción de aminoácidos (por ejemplo, arginina, prolina, isoleucina, metionina, lisina), de vitaminas (por ejemplo pantotenato, filoquinona, tocoferol), de moléculas aromáticas (por ejemplo documento WO9401564), de polioles (por ejemplo xilitol), de poliaminas (por ejemplo espermidina), de hidroxiésteres (por ejemplo etil-4-cloro-3-hidroxitirato) o de otras moléculas de alto valor añadido.

La presente invención se refiere por lo tanto a una cepa de microorganismos optimizados para la producción de moléculas que tienen unas vías de biosíntesis consumidoras de NADPH tal como la definida en la reivindicación 1.

55 En lugar de intentar optimizar para cada biotransformación el ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> en el microorganismo, los inventores han optado por la producción de microorganismos modificados con el fin de obtener diferentes ratios NADPH/NADP<sup>+</sup>, siendo dichos microorganismos modificados utilizados después para realizar las biotransformaciones consumidoras de NADPH.

60 Por "cepa de microorganismos" se entiende, según la invención, un conjunto de microorganismos de una misma especie, que comprende por lo menos un microorganismo de dicha especie. Así, las características descritas para la cepa se aplican a cada uno de los microorganismos de dicha cepa. Asimismo, las características descritas para uno de los microorganismos de la cepa se aplicarán al conjunto de dichos microorganismos que la compone.

65 Entre los microorganismos optimizados según la invención, se citarán las bacterias y las levaduras, los hongos filamentosos y en particular las bacterias y las levaduras de las especies siguientes: *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*,

*Brevibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Penicillium sp.*, *Pichia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Candida sp.*

5 El principio de la optimización del ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> se describe para *E. coli* y *S. cerevisiae*. El mismo principio puede ser aplicado de manera similar a todos los microorganismos cultivados en condiciones aerobias.

10 El principio de la optimización del ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> consiste en limitar las actividades enzimáticas implicadas en la oxidación del NADPH, y en favorecer las actividades enzimáticas que permiten la reducción del NADP<sup>+</sup>. Se limitan las actividades enzimáticas implicadas en la oxidación del NADPH disminuyendo, y más particularmente inactivando, dichas actividades, en particular las actividades de tipo quinona oxidorreductasa y/o transhidrogenasa soluble. Se favorecen las actividades enzimáticas que permiten la reducción del NADP<sup>+</sup> imponiendo el flujo de carbono a través del ciclo de pentosas fosfato y/o modificando la especificidad de cofactor de por lo menos una enzima de tal manera que ésta utiliza el NADP preferentemente al NAD, su cofactor habitual.

15 Las cepas optimizadas según la invención se obtienen mediante biología molecular. El experto en la materia conoce los protocolos que permiten modificar el carácter genético de los microorganismos. Las técnicas de transformación están documentadas y están al alcance del experto en la materia (Sambrook *et al.*, 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Nueva York).

20 Los procedimientos que permiten limitar una actividad enzimática consisten en modificar el gen que permite su expresión por un medio apropiado, por ejemplo aportando una o varias mutación(es) en la parte que codifica el gen en cuestión, o modificando la región promotora, en particular sustituyéndola por una secuencia que permite disminuir la expresión del gen.

25 Los procedimientos que permiten inactivar una actividad enzimática consisten en inactivar el producto de expresión del gen en cuestión por un medio apropiado, o bien en inhibir la expresión del gen en cuestión, o también suprimir por lo menos una parte del gen en cuestión, de manera que su expresión no tenga lugar (por ejemplo delección de una parte o del conjunto de la región promotora necesaria para su expresión), o el producto de expresión haya perdido su función (por ejemplo delección en la parte que codifica el gen en cuestión).

30 De manera preferida, la delección de un gen comprende la supresión de lo esencial de dicho gen y, llegado el caso, su sustitución por un gen marcador de selección que permite facilitar la identificación, el aislamiento y la purificación de las cepas optimizadas según la invención.

35 La inactivación de un gen en *E. coli* se lleva a cabo preferentemente mediante recombinación homóloga (Datsenko, K.A.; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645). Se recuerda brevemente el principio de un protocolo: se introduce en la célula un fragmento lineal, obtenido *in vitro*, que comprende las dos regiones que flanquean el gen, y por lo menos un gen de selección entre estas dos regiones (generalmente un gen de resistencia a un antibiótico), presentando por lo tanto dicho fragmento lineal un gen inactivado. Se seleccionan las células que han sufrido un evento de recombinación y que tienen el fragmento introducido por exposición sobre medio selectivo. Se seleccionan entonces las células que hayan sufrido un evento de doble recombinación, en las cuales el gen nativo se ha sustituido por el gen inactivado. Este protocolo puede ser mejorado utilizando unos sistemas de selección positiva y negativa, con el fin de acelerar la detección de los eventos de dobles recombinaciones.

45 La inactivación de un gen en *S. cerevisiae* se lleva a cabo asimismo de forma preferida mediante recombinación homóloga (Baudin *et al.*, Nucl. Acids Res. 21, 3329-3330, 1993; Wach *et al.*, Yeast 10, 1793-1808, 1994; Brachmann *et al.*, Yeast. 14: 115-32, 1998).

50 Los procedimientos que permiten favorecer una actividad enzimática consisten en estabilizar el producto de expresión del gen en cuestión mediante un medio apropiado por ejemplo, disminuyendo su sensibilidad a unos efectores alostéricos, o en aumentar la expresión de dicho gen de manera que aumente la cantidad de enzima.

55 La sobreexpresión de un gen se puede llevar a cabo mediante el cambio del promotor de este gen *in situ*, por un promotor fuerte o inducible. De manera alternativa, se introduce, en la célula, un plásmido replicativo (simple o multicopias) en el que el gen que se desea sobreexpresar está bajo el control del promotor adecuado. En el caso de una modificación de *Escherichia coli*, se podrá, por ejemplo, utilizar los promotores *Plac*-o, *P<sub>trc</sub>*-o, *ptac*-o, tres promotores fuertes bacterianos para los cuales el operador *lac* (*lacO*) se ha suprimido para hacerlos constitutivos. En el caso de modificaciones de *Saccharomyces cerevisiae*, se podrán por ejemplo utilizar los promotores *P<sub>pgk</sub>*, *P<sub>adh1</sub>*, *P<sub>gal1</sub>*, *P<sub>gal10</sub>*.

60 Los procedimientos que permiten modificar la especificidad de cofactor de una enzima de tal manera que ésta utilice el NADP preferentemente al NAD, consisten en modificar la secuencia del gen que permite la expresión de esta enzima (Bocanegra, J. A. Scrutton, N. S.; Perham, R. N. (1993) Création of an NADP-dependent pyruvate dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. Biochemistry 32: 2737-2740).

Las cepas optimizadas según la invención (es decir, capacidad aumentada de reducción del NADP<sup>+</sup>) comprenden la atenuación, incluso la inactivación, de una o varias actividad(es) enzimática(s) que oxida(n) el NADPH, y en particular, unas actividades de tipo quinona oxidorreductasa y/o transhidrogenasa soluble.

- 5 Se citarán como ejemplos de enzimas que oxidan el NADPH y sin que esta lista sea limitativa, las actividades y los genes siguientes:

Actividades enzimáticas	Número EC	Genes <i>E. coli</i>	Genes <i>S. cerevisiae</i>
Alcohol deshidrogenasa	1.1.1.2	<i>yahK</i>	ADH6
Aldosa reductasa	1.1.1.21		GRE3
Shikimato deshidrogenasa	1.1.1.25	<i>aroE</i>	ARO1
Metilglicoxal reductasa	1.1.1.78		GRE2p
Gamma-glutamil fosfato reductasa	1.2.1.41	<i>proA</i>	PRO2
2,4-dienoil coenzima A reductasa	1.3.1.34	<i>fadH</i>	
Glutamato deshidrogenasa	1.4.1.4	<i>gdhA</i>	GDH1, GDH2
Glutamato sintasa	1.4.1.13	<i>gltB, gltD</i>	GLT1
Metilintetrahidrofolato deshidrogenasa	1.5.1.5	<i>folD</i>	ADE3, MIS1
Transhidrogenasa soluble	1.6.1.1	<i>udhA</i>	
Transhidrogenasa membranaria	1.6.1.2	<i>pntA, pntB</i>	
Quinona oxidorreductasa	1.6.5.5	<i>qor</i>	ZTA1
Nitrito reductasa	1.7.1.4	<i>nirB, nirD</i>	
Sulfito reductasa	1.8.1.2	<i>cysI, cysJ</i>	
Esterol desmetilasa	1.14.13.70		ERG 11
4-Hidroxi-3-metilbut-2-enilo difosfato reductasa	1.17.1.2	<i>ispH</i>	
Flavodoxin reductasa	1.18.1.2	<i>fpr</i>	

- 10 Las cepas optimizadas según la invención (es decir, la capacidad aumentada de reducción del NADP<sup>+</sup>) comprenden asimismo unas modificaciones que permiten favorecer una o varias actividad(es) enzimática(s) que reduce(n) el NADP<sup>+</sup>, y en particular, unas modificaciones que permiten imponer el flujo de carbono a través del ciclo de pentosas fosfato, y/o unas modificaciones que se basan en la especificidad del cofactor de por lo menos una enzima, de tal manera que ésta utiliza el NADP preferentemente al NAD, su cofactor habitual.

- 15 Las actividades susceptibles de ser modificadas en las cepas optimizadas según la invención (es decir, la capacidad aumentada de reducción del NADP<sup>+</sup>) con el fin de favorecer una o varias actividad(es) enzimática(s) que reduce(n) el NADP<sup>+</sup> se describen a continuación:

Actividades enzimáticas	Número EC	Genes <i>E. coli</i>	Genes <i>S. cerevisiae</i>
Fosfoglucosa isomerasa	5.3.1.9	<i>pgi</i>	PGI1
Fosfofructoquinasa	2.7.1.11	<i>pfkA, pfkB</i>	PFK1, PFK2
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	1.1.1.49	<i>zwf</i>	ZWF1
6-Fosfogluconolactonasa	3.1.1.31		SOL1.SOL2, SOL3, SOL4
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	1.1.1.44	<i>gnd</i>	GND1, GND2
6-Fosfogluconato deshidratasa	4.2.1.12	<i>edd</i>	
Malato sintasa	2.3.3.9	<i>aceB</i>	DAL7
Isocitrato liasa	4.1.3.1	<i>aceA</i>	ICL1
Isocitrato deshidrogenasa	1.1.1.42	<i>icd</i>	IDP1, IDP2, IDP3
Isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa	2.7.1.116	<i>aceK</i>	
Dihidrolipoamida deshidrogenasa	1.8.1.4	<i>lpd</i>	LPD1
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	1.2.1.12	<i>gapA, gapC</i>	TDH1, TDH2, TDH3

- 20 Las actividades enzimáticas susceptibles de ser modificadas en las cepas optimizadas según la invención se definen principalmente mediante el uso de la denominación de la proteína o del gen en *E. coli* o *S. cerevisiae*. Sin embargo, este uso tiene un significado más general según la invención y abarca las actividades enzimáticas correspondientes en otros microorganismos. En efecto, utilizando las secuencias de las proteínas y de los genes de *E. coli* o de *S. cerevisiae*, el experto en la materia es capaz de determinar las proteínas y los genes equivalentes en otros microorganismos diferentes de *E. coli* o *S. cerevisiae*.

- 30 Los medios de identificación de las secuencias homólogas y de sus porcentajes de homología son bien conocidos por el experto en la materia, comprendiendo en particular el programa BLAST que se puede utilizar a partir de la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros indicados por defecto en esta página. Las secuencias obtenidas pueden ser entonces explotadas (es decir, alineadas) utilizando por ejemplo los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) o MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), con los parámetros indicados por defecto en estas páginas.

Alternativamente, es posible utilizar el programa CD-Search (<http://www.ncbi.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) que permite identificar unos dominios conservados en las secuencias proteicas de *E. coli* o de *S. cerevisiae* y buscar unas secuencias de otros microorganismos, que presentan el o los mismos dominios. Los dominios conservados están catalogados en la base de datos CDD (Conserved domain database; Marchler-Bauer A, Anderson JB, DeWeese-Scott C, Fedorova ND, Geer LY, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Jacobs AR, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Madej T, Marchler GH, Mazumder R, Nikolskaya AN, Panchenko AR, Rao BS, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Vasudevan S, Wang Y, Yamashita RA, Yin JJ, Bryant SH. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Research* 31:383-387 (2003)), que reúne los datos de tipo PFAM o COG.

Los PFAM (Protein FAMILies database of alignments and hidden markov models; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) representan una amplia colección de alineaciones de secuencias proteicas, Cada PFAM permite visualizar unas alineaciones múltiples, ver unos dominios proteicos, evaluar la repartición entre los organismos, tener acceso a otras bases de datos, visualizar unas estructuras conocidas de proteínas.

Los COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen comparando las secuencias proteicas procedentes de 43 genomas completamente secuenciados que representan 30 líneas filogenéticas mayores. Cada COG se define a partir de por lo menos tres líneas, lo cual permite así identificar unos dominios conservados antiguos.

A partir de las secuencias de consenso identificadas mediante estos diferentes métodos, es posible dibujar unas sondas oligonucleotídicas degeneradas que permiten clonar el gen correspondiente en otro microorganismo. Estas técnicas de rutina de biología molecular son bien conocidas en la técnica y son descritas por ejemplo en Sambrook *et al.* (1989 *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Nueva York.).

Ejemplos de genes que codifican para unas proteínas análogas a la transhidrogenasa soluble de *E. coli* codificada por el gen *udhA*:

Genes	Microorganismos
<i>sth</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
<i>udhA</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2
<i>sthA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01
<i>sth</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>sthA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
<i>udhA</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 3.0.1
<i>sthA</i>	<i>Vibrio cholera</i>
<i>sthA</i>	<i>Yersinia pestis</i>

Ejemplo de genes que codifican para unas proteínas análogas a la quinona oxidorreductasa de *E. coli* codificada por el gen *qor*:

Genes	Microorganismos
<i>qor</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
<i>qor</i>	<i>Brucella suis</i> 1330
CC3759	<i>Caulobacter crescentus</i>
mII0505	<i>Mesorhizobium loti</i>
<i>qor</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV
<i>qor</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ZTA1	<i>S. cerevisiae</i>
SPCC285.01c	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>drgA</i>	<i>Synechocystis sp.</i> PCC6803
<i>qorA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TTC0305	<i>Thermus thermophilus</i> H B8
<i>qor</i>	<i>Yersinia pestis</i> C092

Las cepas optimizadas según la invención (es decir, la capacidad aumentada de reducción del NADP<sup>+</sup>) comprenden la delección de por lo menos un gen que codifica para una actividad que oxida el NADPH, y en particular, la delección de un gen que codifica para una quinona oxidorreductasa (por ejemplo *qor*, ZTA1) y/o un gen que codifica para una actividad transhidrogenasa soluble (por ejemplo *udhA*).

Según un modo preferido de realización de la invención, los genes *udhA* y *qor* son ambos suprimidos.

Según un modo particular de realización de la invención, las cepas optimizadas según la invención comprenden asimismo la delección de uno o varios genes que codifican para las actividades fosfoglucoasa isomerasa (por ejemplo

*pgi*, PGI1) y/o fosfofructoquinasa (por ejemplo *pfkA*, PFK1).

Según otro modo particular de realización de la invención, las cepas optimizadas según la invención comprenden asimismo la modificación de uno o varios genes que codifican para las actividades dihidrolipoamida deshidrogenasa (por ejemplo *lpd*, LPD1) y/o gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (por ejemplo *gapA*, TDH1), consistiendo la modificación en modificar la preferencia de la enzima al provecho del NADP en lugar de NAD, su cofactor habitual.

Las cepas según la invención que tienen la delección de los genes que codifican las actividades fosfoglucosa isomerasa y/o fosfofructoquinasa están adaptadas más particularmente para los procedimientos de biotransformación.

Para aumentar más la cantidad de NADPH disponible en los microorganismos optimizados según la invención, puede ser asimismo ventajoso sobreexpresar por lo menos un gen que codifica para una actividad enzimática entre la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (por ejemplo *zwf*, ZWF1) la 6-fosfogluconolactonasa (por ejemplo SOL1), la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (por ejemplo *gnd*, GND1) la isocitrato deshidrogenasa (por ejemplo *icd*, IDP1) y la transhidrogenasa membranaria (por ejemplo *pntA*) y/o suprimir por lo menos un gen que codifica para una actividad enzimática entre la 6-fosfogluconato deshidratasa (por ejemplo *edd*), la malato sintasa (por ejemplo *aceB*, DAL7), la isocitrato liasa (por ejemplo *aceA*, ICL1) y la isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa (por ejemplo *aceK*).

La presente invención tiene asimismo por objeto un microorganismo optimizado para la producción de NADPH tal como se ha definido anteriormente y a continuación, que comprende asimismo uno o varios genes que codifican para las actividades enzimáticas implicadas en la biotransformación de una molécula de interés, así como uno o varios genes marcadores de selección.

Estos genes pueden ser nativos de la cepa optimizada según la invención o también introducidos en la cepa optimizada según la invención mediante transformación con un vector apropiado, o bien mediante integración en el genoma del microorganismo o también mediante un vector replicativo, llevando dicho vector apropiado uno o varios genes que codifican para dichas enzimas implicadas en la biotransformación de dicha molécula de interés y/o dichos marcadores de selección.

Estos genes comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para una enzima implicada en la biotransformación de la molécula de interés y/o un marcador de selección, siendo la secuencia codificante fusionada a unas secuencias promotoras eficaces en la célula procariota y/o eucariota seleccionada para la biotransformación. El vector (o plásmido) puede ser un vector vehículo entre *E. coli* y otro microorganismo.

La elección de la cepa optimizada para el ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> será determinada en función del tipo de biotransformación (fermentación o bioconversión), de la demanda total en NADPH de la vía de bioconversión considerada, de la naturaleza de la(s) fuente(s) carbonada(s), de la demanda en flujo de biomasa, etc.

La delección de los genes que codifican para las actividades fosfoglucosa isomerasa y/o fosfofructoquinasa debería imponerse cuando no se es capaz de dominar la repartición del flujo de carbono entre la glicólisis y la vía de las pentosas fosfato. La delección de los genes que codifican para la fosfoglucosa isomerasa se elegirá preferentemente para las fermentaciones o cuando la demanda en NADPH necesita, como mínimo, un flujo de reducción de 2 moles de NADP<sup>+</sup> por mol de glucosa importada. La delección de los genes que codifican para la fosfofructoquinasa se seleccionará preferentemente para las bioconversiones o cuando la demanda en NADPH necesita, como mínimo, un flujo de reducción de 3-4 moles de NADP<sup>+</sup> por mol de glucosa importada. La modificación, tal como se ha descrito anteriormente y tal como se describirá a continuación, de los genes que codifican para las actividades dihidrolipoamida deshidrogenasa y/o gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa se realizará cuando las biotransformaciones necesitarán un flujo de reducción, como mínimo, superior a 3 moles de NADP<sup>+</sup> por mol de glucosa importada y en particular para optimizar las cepas *E. coli*  $\Delta$ (*udhA*, *qor*,) o *E. coli*  $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*) o *E. coli*  $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pfkA*, *pfkB*). Las demás modificaciones citadas, a saber la sobreexpresión de por lo menos un gen que codifica para una actividad enzimática entre la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la 6-fosfogluconolactonasa, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa y la transhidrogenasa membranaria y/o la delección de por lo menos un gen que codifica para una actividad enzimática entre la 6-fosfogluconato deshidratasa, la malato sintasa, la isocitrato liasa y la isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa, podrán ser realizadas con el fin de afinar la optimización del ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> a las necesidades de la célula y del procedimiento de biotransformación en cuestión.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de las cepas optimizadas según la invención tal como se ha definido anteriormente y tal como se definirá a continuación, en el que se suprime un gen tomado de entre los que codifican para las actividades quinona oxidoreductasa y transhidrogenasa soluble y, llegado el caso, se suprime un gen tomado de entre los que codifican para las actividades glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconolactonasa, y/o se modifica por lo menos un gen que codifica unas enzimas a NAD, en particular para las actividades dihidrolipoamida deshidrogenasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, con el fin de que éstas utilicen preferentemente el NADP y, llegado el caso, se suprime por lo menos un gen seleccionado de entre los que codifican para las actividades 6-fosfogluconato deshidratasa, malato sintasa, isocitrato liasa e

isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa, siendo estas delecciones y modificaciones realizadas mediante un medio apropiado, y/o se sobreexpresa por lo menos un gen seleccionado de entre los que codifican para las actividades glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconolactonasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y transhidrogenasa membranaria, o bien transformando la cepa con un vector apropiado que permite la sobreexpresión, o bien modificando la fuerza del promotor endógeno que controla el gen a sobreexpresar.

Según un modo particular de realización de la invención, el procedimiento de preparación de las cepas según la invención comprende asimismo la transformación de las cepas optimizadas con por lo menos un vector apropiado que comprende uno o varios genes que codifican una o varias enzimas implicadas en la biotransformación de una molécula de interés, así como uno o varios genes marcadores de selección.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de estas cepas optimizadas según la invención para las biotransformaciones NADPH-dependientes permitiendo así una mejora del rendimiento de biotransformación con relación a una cepa no optimizada para el NADPH.

Las biotransformaciones se realizarán utilizando unas cepas definidas según la invención en las que se expresarán unos genes que codifican las actividades enzimáticas que catalizan unas reacciones NADPH-dependientes. El experto en la materia sabrá fácilmente identificar tales enzimas, se citarán para ejemplos y sin que esta lista sea limitativa, las enzimas siguientes: EC 1.1.1.10 L-xilulosa reductasa, EC 1.1.1.21 metilglicoxal reductasa, EC 1.1.1.51 3(o 17) $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, EC 1.1.1.54 alil-alcohol deshidrogenasa, EC 1.1.1.80 isopropanol deshidrogenasa, EC 1.1.1.134 dTDP-6-deoxi-L-talosa 4-deshidrogenasa, EC 1.1.1.149 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, EC 1.1.1.151 21-hidroxiesteroide deshidrogenasa, EC 1.1.1.189 prostaglandina-E<sub>2</sub> 9-reductasa, EC 1.1.1.191 indol-3-acetaldehído reductasa, EC 1.1.1.207 (-)-mentol deshidrogenasa, EC 1.1.1.234 flavanona 4-reductasa, EC 1.2.1.50 long-chain-fatty-acil-CoA reductasa, EC 1.3.1.4 cortisona  $\alpha$ -reductasa, EC 1.3.1.23 colesteno 5 $\beta$ -reductasa, EC 1.3.1.70  $\Delta^{14}$ -esterol reductasa, EC 1.4.1.12 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa, EC 1.5.1.10 sacaropina deshidrogenasa, L-glutamata-forming, EC 1.7.1.6 azobenceno reductasa, EC 1.8.1.5 2-oxopropil-CoM reductasa (carboxilado), EC 1.10.1.1 *trans*-acenafteno-1,2-diol deshidrogenasa, EC 1.14.13.7 fenol 2-monooxigenasa, EC 1.14.13.12 benzoato 4-monooxigenasa, EC 1.14.13.26 fosfatidilcolina 12-monooxigenasa, EC 1.14.13.64 4-hidroxibenzoato 1-hidroxilasa, EC 1.14.13.70 esterol 14-demetilasa, EC 1.16.1.5 acuacobalamina reductasa, EC 1.17.1.1 CDP-4-dehidro-6-deoxiglucosa reductasa, EC 1.18.1.2 ferredoxina-NADP reductasa.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de producción de una molécula de interés de la cual al menos una de las reacciones de la vía de biosíntesis es NADPH-dependiente, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- a) cultivar unos microorganismos optimizados según la invención en un medio de cultivo apropiado que favorece su crecimiento y que comprende las sustancias necesarias para la realización de la biotransformación mediante fermentación o biotransformación, con la excepción del NADPH, y
- b) extraer la molécula de interés del medio y, llegado el caso, purificarla.

De manera preferida, la molécula de interés se selecciona de entre los aminoácidos, las vitaminas, los esteroides, los flavonoides, los ácidos grasos, los ácidos orgánicos, los polioles y los hidroxiésteres. Para los aminoácidos o sus precursores, se citarán en particular la lisina, la metionina, la treonina, la prolina, el ácido glutámico, la homoserina, la isoleucina y la valina. Para las vitaminas o sus precursores, se citarán en particular el pantoato, el transneuroesporreno, la filoquinona, los tocoferoles. Para los esteroides, se citarán en particular el escualeno, el colesterol, la testosterona, la progesterona, la cortisona. Para los flavonoides, se citarán en particular la frambinona y la vestinona. Para los ácidos orgánicos, se citarán el ácido coumárico, el ácido 3-hidroxi propiónico. Para los polioles, se citarán el sorbitol, el xilitol, el glicerol. Para los hidroxiésteres, se citarán el etil-3-hidroxi butirato, el etil-4-cloro-3-hidroxi butirato.

En el caso de una bioconversión, el procedimiento comprende asimismo la adición del sustrato a "convertir" en el medio de cultivo apropiado.

El medio de cultivo citado en la etapa b) del procedimiento según la invención definido anteriormente comprende por lo menos un carbohidrato asimilable seleccionado de entre diferentes azúcares asimilables, tales como la glucosa, la galactosa, la sacarosa, la lactosa, o las melazas, o los subproductos de estos azúcares. Una fuente de carbono simple muy particularmente preferida es la glucosa. Otra fuente de carbono simple preferida es la sacarosa. El medio de cultivo puede contener además una o varias sustancias (por ejemplo aminoácidos, vitaminas, sales minerales, etc.) que favorecen el crecimiento del microorganismo y/o la producción de la molécula de interés. En particular, el medio mineral de cultivo para *E. coli* podrá así ser de composición idéntica o similar a un medio M9 (Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:120-128), un medio M63 (Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) o un medio tal como el definido por Schaefer *et al.* (1999, Anal. Biochem. 270: 88-96).

La definición de las condiciones de biotransformación es de la competencia del experto en la materia. Se fermentan en particular los microorganismos a una temperatura comprendida entre 20°C y 55°C, preferentemente entre 25°C y 40°C, más particularmente aproximadamente 30°C para *S. cerevisiae* y aproximadamente 37°C para *E. coli*.

- 5 Los ejemplos se proporcionan únicamente a título de ilustración de la invención y no limitan de ninguna forma el modo de realización ni el alcance de la invención.

**Ejemplo 1: Cálculo de los rendimientos óptimos teóricos de bioconversión del etilacetoacetato en etil-3-hidroxi-3-butanato**

- 10 a) bioconversión con *E. coli*

Unas modelizaciones predictivas se realizan utilizando el algoritmo MetOpt®-Coli, un modelo estequiométrico desarrollado por la compañía METabolic EXplorer, que permite definir 1) el rendimiento máximo de producción en etil-3-hidroxi-3-butanato a partir del etilacetoacetato, 2) la mejor distribución de flujo a partir de la glucosa para asegurar las necesidades de crecimiento y de equilibrios redox necesarios para el desarrollo de la célula y alcanzar el rendimiento máximo de bioconversión.

- 15 Los parámetros impuestos al modelo son en particular 1) un flujo de importación de glucosa a 3 mmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, 2) un porcentaje de crecimiento variable de 0, 0,15 y 0,25 h<sup>-1</sup>, 3) un flujo de la transhidrogenasa membranaria (*pntAB*) variable e inferior o igual a 1 mmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. El valor límite de flujo de la transhidrogenasa membranaria se determina a partir de la bibliografía (Hanson, 1979; Anderlund *et al.*, 1999; Emmerling *et al.*, 2002); 4) el flujo de mantenimiento ha sido limitado entre 5 y 22 mmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.

- 25 En todos los casos, el modelo sugiere la delección de los genes *udhA* y *qor*. En la práctica, sin embargo, la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*)] no permitirá obtener un rendimiento equivalente al rendimiento óptimo teórico, debido a que será difícil mantener la repartición adecuada de flujo de carbono entre la vía de las pentosas fosfato y la de la glicólisis, siendo esta repartición variable con el porcentaje de crecimiento. En la práctica, se preferirá por lo tanto utilizar las cepas *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pfkA*, *pfkB*)] o [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*)], dependiendo la selección entre estas dos cepas del porcentaje de crecimiento de la cepa durante el procedimiento de bioconversión.

Los rendimientos óptimos teóricos de bioconversión del etilacetoacetato en etil-3-hidroxi-3-butanato han sido calculados para diferentes cepas de *E. coli* optimizadas según la invención:

	$\mu = 0$	$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
$\Delta$ ( <i>udhA</i> , <i>qor</i> , <i>pgi</i> )	1,82	1,74	1,22
$\Delta$ ( <i>udhA</i> , <i>qor</i> , <i>pgi</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente	4,29	3,64	2,43
$\Delta$ ( <i>udhA</i> , <i>qor</i> , <i>pgi</i> ) <i>lpd</i> -NADP dependiente	5,67	3,46	1,99
$\Delta$ ( <i>udhA</i> , <i>qor</i> , <i>pgi</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente <i>lpd</i> -NADP dependiente	6,86	4,96	3,33
$\Delta$ ( <i>udhA</i> , <i>qor</i> , <i>pfkA</i> , <i>pfkB</i> )	6,76	4,65	0,19
$\Delta$ ( <i>udhA</i> , <i>qor</i> , <i>pfkA</i> , <i>pfkB</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente	8,16	5,54	1,02
$\Delta$ ( <i>udhA</i> , <i>qor</i> , <i>pfkA</i> , <i>pfkB</i> ) <i>lpd</i> -NADP dependiente	8,33	5,60	1,77
$\Delta$ ( <i>udhA</i> , <i>qor</i> , <i>pfkA</i> , <i>pfkB</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente <i>lpd</i> -NADP dependiente	9,33	6,38	2,60

- 35 **Rendimientos óptimos teóricos de bioconversión del etilacetoacetato en etil-3-hidroxi-3-butanato (mol por mol de glucosa) por unas cepas de *E. coli* optimizadas en su capacidad de reducción del NADP<sup>+</sup>**

- 40 Con el fin de mejorar aún más el rendimiento óptimo teórico de las cepas optimizadas según la invención, se pueden tener en cuenta unas modificaciones suplementarias, tales como la sobreexpresión de por lo menos un gen seleccionado de entre *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* e *icd* y/o la delección de por lo menos un gen seleccionado de entre *edd*, *aceA*, *aceB* y *aceK*.

- 45 b) bioconversión con *S. cerevisiae*

- Las modelizaciones predictivas se realizan utilizando el algoritmo MetOpt®-Scere, un modelo estequiométrico desarrollado por la compañía, que permite definir 1) el rendimiento máximo de producción en etil-3-hidroxi-3-butanato a partir del etilacetoacetato, 2) la mejor distribución de flujo a partir de la glucosa para asegurar las necesidades de crecimiento y de equilibrios redox necesarios para el desarrollo de la célula y alcanzar el rendimiento máximo de bioconversión.

- 50 Los parámetros impuestos al modelo son en particular 1) un flujo de importación de glucosa a 3 mmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, 2) un porcentaje de crecimiento variable de 0, 0,15 y 0,25 h<sup>-1</sup>, 3) un flujo de mantenimiento inferior o igual a 22 mmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. 4) las reacciones de los aldehídos deshidrogenasa (ALD2, ALD3, ALD6) son irreversibles e impuestos en el sentido acetato + NAD(P)H → acetaldehído + NAD(P); la levadura no posee ninguna actividad equivalente a *udhA* o *pntA*,B.



El modelo permite tener en cuenta la compartimentación mitocondrial y peroxisomal.

5 En todos los casos, el modelo sugiere la delección de un gen que codifica para una enzima que oxida el NADPH y en particular, del gen ZTA1. En la práctica, sin embargo, la cepa *S. cerevisiae* [ $\Delta$ ZTA1] no permitirá obtener un rendimiento equivalente al rendimiento óptimo teórico, puesto que será difícil mantener la repartición adecuada de flujo de carbono entre la vía de las pentosas fosfato y la de la glicólisis, siendo esta repartición variable con el porcentaje de crecimiento. En la práctica, se preferirá por lo tanto utilizar las cepas *S. cerevisiae* [ $\Delta$  (ZTA1, PFK1, PFK2)] o [ $\Delta$  (ZTA1, PGI1)], dependiendo de la selección entre estas dos cepas del porcentaje de crecimiento de la cepa durante el procedimiento de bioconversión.

Los rendimientos óptimos teóricos de bioconversión del etilacetoacetato en etil-3-hidroxitbutirato han sido calculados para diferentes cepas de *S. cerevisiae* optimizadas según la invención:

	$\mu = 0$	$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
$\Delta$ (ZTA1,PGI1)	2,42	2,00	1,73
$\Delta$ (ZTA1 ,PGI1 ) TDH1,2,3-NADP dependiente	4,22	3,50	3,03
$\Delta$ (ZTA1,PGI1) LPD1-NADP dependiente	4,08	3,29	2,77
$\Delta$ (ZTA1,PGI1) TDH1,2,3-NADP dependiente LPD1- NADP dependiente	6,17	5,01	4,23
$\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2)	12,00	8,18	5,64
$\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) TDH1,2,3-NADR dependiente	12,00	9,11	7,19
$\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) LPD1-NADP dependiente	12,00	8,44	6,06
$\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) TDH1,2,3-NADP dependiente LPD1-NADP dependiente	12,00	9,28	7,46

15 **Rendimientos óptimos teóricos de bioconversión del etil-acetoacetato en etil-3-hidroxitbutirato (mol por mol de glucosa) por unas cepas de *S. cerevisiae* optimizadas en su capacidad de reducción del NADP<sup>+</sup>**

20 Con el fin de mejorar aún más el rendimiento óptimo teórico de las cepas optimizadas según la invención, se pueden tener en cuenta unas modificaciones suplementarias, tales como la sobreexpresión de por lo menos un gen seleccionado de entre ZWF, SOL1, SOL2, SOL3, SOL4, GND1, GND2, IDP1, IDP2 e IDP3 y/o la delección de por lo menos un gen seleccionado de entre ICL1 y DAL7.

25 **Ejemplo 2: Construcción de la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*)]**

La inactivación del gen *udhA* se lleva a cabo mediante recombinación homóloga según la técnica descrita por Datsenko y Wanner (One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97: 6640-6645).

30 Esta técnica consiste en insertar un casete de resistencia a un antibiótico (cloramfenicol) suprimiendo al mismo tiempo la mayor parte del gen en cuestión. Para ello, se sintetiza un par de oligonucleótidos, estando cada uno constituidos por 100 pb de los cuales 80 pb (minúsculas) son homólogos con el gen a suprimir (por ejemplo *udhA*) y 20 pb (mayúsculas) son homólogos con el casete de resistencia al cloramfenicol:

35 DudhAF  
ggtgccgctgcagcagttatcgagcgttatcaaaatgttgccgctgacccactggggcaccatcccgtcgaaagcCATATGAATATCCTCCTTA  
G

40 DudhAR  
CccagaatctctttgttcccgatggaacaaaatcttcagcgtgccacggtcatgccgacgattgtgctgctgagcagTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

45 El casete antibiótico llevado por el plásmido pKD3 se amplifica mediante PCR utilizando los oligonucleótidos DudhAF y DudhAR. El producto PCR obtenido se introduce entonces mediante electroporación en la cepa *E. coli* [pKD46], que lleva el gen que codifica la Red recombinasa, enzima que cataliza la recombinación homóloga. Los transformantes que resisten al cloramfenicol son entonces seleccionados, y la inserción del casete de resistencia se verifica mediante un análisis PCR utilizando los oligonucleótidos UdhAF y UdhAR:

50 UdhAF  
Ggccgctcaggatagccagataaatgac

UdhAR  
Gcgggatcactttactgccagcgtgctg

55 Después, se elimina el casete de resistencia al cloramfenicol. Para ello, el plásmido pCP20 que lleva la recombinasa FLP que actúa a nivel de los sitios FRT del casete de resistencia al cloramfenicol, se introduce en las cepas

recombinantes mediante electroporación. Después, tras una serie de cultivo a 42°C, la pérdida del casete de resistencia al antibiótico se verifica mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos UdhAF y UdhAR.

La inactivación del gen *qor* se realiza según la misma técnica, utilizando los oligonucleótidos siguientes:

5 DqorF  
 ggtggcccgaagtactcaagccgtagagttcactcctgccgatccggcggagaatgaaatccaggctgaaaataaagcCATATGAATATCCTCCTT  
 AG

10 DqorR  
 cgcccggctttccagaatctcatgctgcacgctgctgcacatcttcagcggatattctgctgctcggcgacatcgacctaaTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

QorF  
 Cgccaacaccgactgctccgcttcgatcg

15 QorR  
 cagcgttatgaccgctggcgttactaaggg

20 Por razones prácticas, puede ser interesante suprimir los dos genes simultáneamente. Para ello, cada gen es sustituido por un casete de resistencia a un antibiótico diferente (por ejemplo cloramfenicol para *udhA* y kanamicina para *qor*).

La cepa obtenida es por lo tanto *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*)].

25 **Ejemplo 3: Construcción del plásmido pSK-PgapA-GRE2p, introducción en la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*)] y biotransformación del etilacetoacetato en etil-3-hidroxitirato**

El plásmido pSK-PgapA se construye mediante inserción del promotor *gapA* en el vector pBluescript-SK (pSK). Para ello, el promotor *gapA* de *E. coli* se amplifica con la polimerasa *Pwo* a partir del ADN cromosómico.

30 El producto PCR obtenido es digerido después por la enzima de restricción *HinIII* y se liga al vector pSK digerido por la enzima de restricción *HindIII* y desfosforila para dar el plásmido pSK-PgapA. El vector pSK lleva un origen de replicación para *E. coli* y un gen de resistencia a la ampicilina.

35 El plásmido pSK-PgapA se introduce entonces en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  para la verificación de la construcción. La secuenciación del promotor *gapA* del plásmido pSK-PgapA con el oligonucleótido universal M13 directo se realiza después para confirmar la construcción.

40 El plásmido pSK-PgapA-GRE2p se construye mediante la inserción del gen GRE2p en el plásmido pSK-PgapA. Para ello, se amplifica el gen GRE2p de *Saccharomyces cerevisiae* con la polimerasa *Pwo* a partir del ADN cromosómico utilizando los oligonucleótidos siguientes:

Ome119\_GRE2F (NdeI)  
 Acgtacgtggcatatgtcagtttctgcttcaggtgtaacggg

45 Ome120\_GRE2R (PstI)  
 Acgtacctgcagttatattctgccctcaaattttaaattggg

50 El producto PCR obtenido es digerido después por las enzimas de restricción *NdeI* - *PstI* y se ligan al vector pSK-PgapA digerido por las enzimas de restricción *NdeI* - *PstI* y se desfosforilan para dar el plásmido pSK-PgapA-GRE2p. El plásmido pSK-PgapA lleva un origen de replicación para *E. coli* y un gen de resistencia a la ampicilina.

55 El plásmido pSK-PgapA-GRE2p se introduce entonces en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  para la verificación de la construcción. La secuenciación del gen GRE2p del plásmido pSK-PgapA-GRE2p con los oligonucleótidos universales M13 inverso y M13 directo se realiza después para confirmar la construcción.

El plásmido validado se introduce entonces en la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*)] (ejemplo 2) mediante electroporación.

60 La cepa obtenida *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*)] pSK-PgapA-GRE2p] se cultiva entonces en un medio que contiene glucosa y etilacetoacetato. Una cepa de *E. coli* [pSK-PgapA-GRE2p] se cultiva en las mismas condiciones.

Cuando los cultivos han terminado, se compara:

- 65 - la evolución de la biomasa de cada cepa durante la fase de bioconversión,  
 - la cantidad de etil-3-hidroxitirato producido en el medio extracelular,

- la cantidad de etil-3-hidroxitirato acumulado en las células,
- la productividad en etil-3-hidroxitirato,
- el rendimiento glucosa/etil-3-hidroxitirato.

5 Se podrá observar que la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*)] pSK-PgapA-GRE2p] presenta un rendimiento de producción de etil-3-hidroxitirato aumentado con relación a la cepa no optimizada.

**Ejemplo 4: Construcción de la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*)] pSK-PgapA-GRE2p] y biotransformación del etilacetoacetato en etil-3-hidroxitirato**

10 La inactivación del gen *pgi* se lleva a cabo en la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*)] (ejemplo 2) utilizando la técnica descrita en el ejemplo 2, y los oligonucleótidos siguientes:

15 DpgiF  
ccaacgcagaccgctgctgagcaggcactacagaaacacttcgatgaaatgaaagacgttacgatgcccgatcttttgcTGTAGGCTGGAGCTGCTT  
CG

20 DpgiR  
gcgccacgctttatagcgggtaatacagaccattggctgagctatcgtggctgctgattctttatcatctttcagctctgCATATGAATATCCTCCTTAG

25 pgiF  
gcggggcgggtgtcaacgatggggtcatgc

30 pgiR  
cggtatgattccggttaatacagacaag

La construcción se realiza en medio rico (por ejemplo LB). Se introduce entonces en la cepa obtenida el plásmido pSK-PgapA-GRE2p (ejemplo 3) mediante electroporación, y la cepa resultante *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*)] pSK-PgapA-GRE2p] se selecciona sobre medio rico.

35 La cepa obtenida se cultiva entonces en medio mínimo que contiene glucosa y etilacetoacetato. Una cepa de *E. coli* [pSK-PgapA-GRE2p] se cultiva en las mismas condiciones.

Quando los cultivos han terminado, se compara:

- la evolución de la biomasa de cada una de las cepas durante la fase de bioconversión,
- la cantidad de etil-3-hidroxitirato producido en el medio extracelular,
- la cantidad de etil-3-hidroxitirato acumulado en las células,
- la productividad en etil-3-hidroxitirato,
- el rendimiento glucosa/etil-3-hidroxitirato.

Se podrá observar que la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*)] pSK-PgapA-GRE2p] presenta un rendimiento de producción de etil-3-hidroxitirato aumentado con relación a la cepa no optimizada.

	mol <sub>EB</sub> /mol <sub>Glucosa</sub>
MG1655 pSK-PgapA-GRE2p	0,75
MG1655 $\Delta$ ( <i>udhA</i> , <i>qor</i> , <i>pgi</i> ) pSK-PgapA-GRE2p	2,12

**Ejemplo 5; Construcción de la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *edd*)] pSK-PgapA-GRE2p] y biotransformación del etilacetoacetato en etil-3-hidroxitirato**

50 La inactivación del gen *edd* se lleva a cabo en la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*)] (ejemplo 4) utilizando la técnica descrita en el ejemplo 2, y los oligonucleótidos siguientes:

55 DeddF (1932582-1932499)  
CgcgcgagactcgctctgttatctcgcgggatagaacaagcgaacttcgaccgttcgcttcgagtgccgagcagccCATATGAATATCCTCCTTAG  
TCG

60 DeddR (1930866-1930943)  
cgcaaggcgcgtgaataatcagctcgttcccacgcgtgacgcgctcaggtcaggaatgtgcggttcgagcagccCATATGAATATCCTCCTTAG

EddF (1932996-1932968)  
Gggtagactccattactgagcgtgggcg

EddR (1930439-1930462)

Ccccggaatcagaggaatagtccc

La construcción se realiza en medio rico (por ejemplo LB). Se introduce entonces en la cepa obtenida cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *edd*)] el plásmido pSK-PgapA-GRE2p (ejemplo 3) mediante electroporación, y la cepa resultante *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *edd*)] pSK-PgapA-GRE2p] se selecciona sobre medio rico.

La cepa obtenida cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *edd*)] pSK-PgapA-GRE2p] se cultiva entonces en medio mínimo que contiene glucosa y etilacetoacetato. Una cepa de *E. coli* [pSK-PgapA-GRE2p] se cultiva en las mismas condiciones.

Cuando los cultivos han terminado, se compara:

- la evolución de la biomasa de cada una de las cepas durante la fase de bioconversión,
- la cantidad de etil-3-hidroxitirato producido en el medio extracelular,
- la cantidad de etil-3-hidroxitirato acumulado en las células,
- la productividad en etil-3-hidroxitirato,
- el rendimiento glucosa/etil-3-hidroxitirato.

Se podrá observar que la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *edd*)] pSK-PgapA-GRE2p] presenta un rendimiento de producción de etil-3-hidroxitirato aumentado con relación a la cepa no optimizada.

**Ejemplo 6: Construcción de la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pfkA*, *pfkB*) pSK-PgapA-GRE2p] y biotransformación del etilacetoacetato en etil-3-hidroxitirato**

La inactivación de los genes *pfkA* y *pfkB* se lleva a cabo en la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*)] (ejemplo 2) utilizando la técnica descrita en el ejemplo 2, y los oligonucleótidos siguientes:

DpfkAF

ggt gtg ttg aca agc ggc ggt gat gcg cca ggc atg aac gcc gca att cgc ggg gtt gtt cgt tct gcg ctg aca gaa ggTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

DpfkAR

TtcgcgcagtcaccagccagtcaccttgaacggacgctcatgtttcgtatagcgtgatgtcgtggtgaaccagctgCATATGAATATCCTCCTTAG

PfkAF

Cgcacgcggcagtcagggccgacccgc

PfkAR

ccctacgccccacttgttcatgccccg

DpfkBF (1804421-1804499)

gcgccctctctgatagcgaacaattaccgcaaatatcccgaaggaaaactgcgctgtaccgcaccggtgttcgTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

DpfkBR (1805320-1805241)

gcgggaaagtaagcgtaaaatttttgcgtatcgtcatgggagcacagacgtgtccctgattgagtggtgctgcactccCATATGAATATCCTCCTTAG

PfkBF (1803996-1804025)

tggcaggatcatccatgacagtaaaaacgg

PfkBR (1805657-1805632)

gccggttgacttgggtaagccccg

La construcción se realiza en medio rico (por ejemplo LB). Se introduce entonces en la cepa obtenida cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pfkA*, *pfkB*)] el plásmido pSK-PgapA-GRE2p (ejemplo 3) mediante electroporación, y la cepa resultante *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pfkA*, *pfkB*)] pSK-PgapA-GRE2p] se selecciona sobre medio rico.

La cepa obtenida cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pfkA*, *pfkB*)] pSK-PgapA-GRE2p] se cultiva entonces en medio mínimo que contiene glucosa y etilacetoacetato. Una cepa de *E. coli* [pSK-PgapA-GRE2p] se cultiva en las mismas condiciones.

Cuando los cultivos han terminado, se compara:

- la evolución de la biomasa de cada una de las cepas durante la fase de bioconversión,
- la cantidad de etil-3-hidroxitirato producido en el medio extracelular,
- la cantidad de etil-3-hidroxitirato acumulado en las células,

- la productividad en etil-3-hidroxibutirato,
- el rendimiento glucosa/etil-3-hidroxibutirato.

5 Se podrá observar que la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pfkA*, *pfkB*)] pSK-PgapA-GRE2p] presenta un rendimiento de producción de etil-3-hidroxibutirato aumentado con relación a la cepa no optimizada.

	mol <sub>EB</sub> /mol <sub>Glucosa</sub>
MG1655 pSK-PgapA-GRE2p	0,75
MG1655 $\Delta$ ( <i>udhA</i> , <i>qor</i> , <i>pfkA</i> , <i>pfkB</i> ) pSK-PgapA-GRE2p	3,46

**Ejemplo 7: Construcción de la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *lpd*) p*lpd*<sup>\*</sup>, pSK-PgapA-GRE2p] y biotransformación del etilacetoacetato en etilo-3-hidroxibutirato**

10 El gen *lpd* que codifica la dihidrolipoamida deshidrogenasa NAD-dependiente, implicada en el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa, se suprime utilizando la técnica descrita en el ejemplo 2, salvo que la cepa inicial es la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*)] descrita en el ejemplo 4 en lugar de ser una cepa salvaje. La construcción y la selección de la cepa modificada se llevan a cabo en medio rico (por ejemplo LB). La cepa obtenida es *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *lpd*)].

15 Por otra parte, se construye el plásmido p-*lpd*<sup>\*</sup> que permite la sobreexpresión de una dihidrolipoamida deshidrogenasa NADP-dependiente. Existen diferentes posibilidades para modificar la especificidad de cofactor de una enzima. Por ejemplo, Bocanegra *et al.* (1993) dan a conocer un método para crear una dihidrolipoamida deshidrogenasa NADP-dependiente.

20 Los plásmidos p-*lpd*<sup>\*</sup> y pSK-PgapA-GRE2p son entonces introducidos mediante electroporación en la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *lpd*)], alternativamente, se puede elegir clonar *lpd*<sup>\*</sup> sobre pSK-PgapA-GRE2p; se obtendría entonces el plásmido pSK-PgapA-GRE2p-*lpd*<sup>\*</sup> que se introduciría mediante electroporación en la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *lpd*)]. La construcción y la selección de la cepa modificada se llevan a cabo en medio rico (por ejemplo LB).

25 La cepa obtenida cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *lpd*)pSK-PgapA-GRE2p, p-*lpd*<sup>\*</sup>] se cultiva entonces en medio mínimo que contiene glucosa y etilacetoacetato. Una cepa de *E. coli* [pSK-PgapA-GRE2p] se cultiva en las mismas condiciones.

30 Cuando los cultivos han terminado, se compara:

- la evolución de la biomasa de cada una de las cepas durante la fase de bioconversión,
- la cantidad de etil-3-hidroxibutirato producido en el medio extracelular,
- la cantidad de etil-3-hidroxibutirato acumulado en las células,
- la productividad en etil-3-hidroxibutirato,
- el rendimiento glucosa/etil-3-hidroxibutirato.

35 Se podrá observar que la cepa *E. coli* [ $\Delta$ (*udhA*, *qor*, *pgi*, *lpd*)pSK-PgapA-GRE2p, p-*lpd*<sup>\*</sup>] presenta un rendimiento de producción de etil-3-hidroxibutirato aumentado con relación a la cepa no optimizada.

**Ejemplo 8: Construcción del plásmido pRSGK-GRE2p**

45 El plásmido pYGK se construye mediante inserción del promotor *Ppgk*, del sitio de multiclonación y del terminador *cycl* del vector pYPG2 en el vector pBluescript-SK (pSK). Para ello, el promotor *Ppgk*, el sitio de multiclonación y el terminador *cycl* son amplificados con la polimerasa *Pfu Turbo* a partir del vector pYPG2. El producto PCR obtenido se digiere después por las enzimas de restricción *SacII* - *NotI*, y se liga al vector pSK digerido mediante las enzimas de restricción *Apal* - *SmaI*, se liga y después es digerido por las enzimas de restricción *NotI* - *SacII* y se desfosforila para dar el plásmido pYGK.

50 El plásmido pYGK se introduce entonces en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  para verificar la construcción. La secuenciación del promotor *PpGK*, del sitio de multiclonación y del terminador *cycl* del plásmido pYGK con los oligonucleótidos universales M13 inverso y M13 directo se realiza después para confirmar la construcción.

55 El plásmido pYGK-GRE2p se construye después mediante la inserción del gen GRE2p en el plásmido pYGK. Para ello, el gen GRE2p de *Saccharomyces cerevisiae* se amplifica con la polimerasa *Pwo* a partir del ADN cromosómico, utilizando los oligonucleótidos siguientes:

60 Ome376\_Gre2 pYGK F (SmaI)  
A c g t a c g t c c c c c g g a a a a t g t c a g t t t t c g t t t c a g g t g c

Ome377\_Gre2 pYGKR (ApaI)  
ACGTACGGGCCCTTATATTCTGCCCTCAAATTTTAAAATTTGGG

5 El producto PCR obtenido es digerido después por las enzimas de restricción *ApaI* - *SmaI* y se liga al vector pYGK digerido mediante las enzimas de restricción *ApaI* - *SmaI* y se desfosforila para dar el plásmido pYGK-FRE2p.

10 El plásmido pYGK-FRE2p se introduce entonces en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  para la verificación de la construcción. La secuenciación del gen GRE2p del plásmido pYGK-GRE2p con los oligonucleótidos universales M13 inverso y M13 directo se realiza después para confirmar la construcción.

15 El plásmido pRSGK-GRE2p se obtiene finalmente mediante digestión de los plásmidos pYGK-GRE2p y pRS426 con las enzimas de restricción *NotI* - *SacII* y después ligación.

### 15 **Ejemplo 9: Construcción de la cepa *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1)pRSGK-GRE2p] y biotransformación del etilacetato en etil-3-hidroxitirato**

20 La inactivación del gen ZTA1 se lleva a cabo insertando un marcador (resistencia a un antibiótico, auxotrofia) suprimiendo al mismo tiempo la mayor parte del gen en cuestión. La técnica utilizada está descrita por Brachmann *et al.* (Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications, *Yeast*, 1998, 14: 115-32). Se puede utilizar asimismo la técnica descrita por Wach *et al.* (New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 1994, 10: 1793-1808).

25 En todos los casos se obtiene una cepa final *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1)], en la que se introduce entonces el plásmido pRSGK-GRE2p (ejemplo 8).

30 Alternativamente, se puede elegir asimismo introducir el plásmido pRSGK-GRE2p en una cepa  $\Delta$ (ZTA1), disponible, por ejemplo la cepa EUROSCARF Y33183 (genotipo: BY4743; Mat *a* $\alpha$ ; *his3D1/his3D1*; *leu2D0/leu2D0*; *lys2D0/LYS2*; *MET15/met15D0*, *ura3D0/ura3D0*; *YBR046c::kanMX4/YBR046c::kanMX4*). Es posible entonces después de la esporulación recuperar una cepa homocigoto *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1) pRSGK-GRE2p].

35 La cepa obtenida *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1) pRSGK-GRE2p] se cultiva después en medio mínimo que contiene glucosa y etilacetato.

La cepa control *S. cerevisiae* [pRSGK-GRE2p] se cultiva en las mismas condiciones.

Cuando los cultivos han terminado, se compara:

- 40
- la evolución de la biomasa de cada una de las cepas durante la fase de bioconversión,
  - la cantidad de etil-3-hidroxitirato producido en el medio extracelular,
  - la cantidad de etil-3-hidroxitirato acumulado en las células,
  - la productividad en etil-3-hidroxitirato,
  - el rendimiento glucosa/etil-3-hidroxitirato.

45 Se podrá observar que la cepa *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1) pRSGK-GRE2p] presenta un rendimiento de producción de etil-3-hidroxitirato aumentado con relación a la cepa no optimizada.

### 50 **Ejemplo 10: Construcción de la cepa *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PGI1) pRSGK-GRE2p] y biotransformación del etilacetato en etil-3-hidroxitirato**

La inactivación del gen PGI1 se lleva a cabo en la cepa *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1) pRSGK-GRE2p] utilizando la técnica descrita en el ejemplo 9, y los oligonucleótidos siguientes:

55 Dpgi1F  
CCAACGCAGACCGCTGCCTGGCAGGCACTACAGAAACACTTCGATGAAATGAAAGACGTTACGATCGCCGATCT  
TTTTGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

60 Dpgi1R  
GCGCCACGCTTTATAGCGGTTAATCAGACCATTGGTCGAGCTATCGTGGCTGCTGATTTCTTTATCATCTTTTCAG  
CTCTGCATATGAATATCCTCCTTAG

Pgi1F  
GCGGGCGGTTGTCAACGATGGGGTCATGC

65 Pgi1R

CGGTATGATTTCCGTTAAATTACAGACAAG

Alternativamente, es posible utilizar una cepa  $\Delta$ (PGI1) disponible, por ejemplo la cepa EUROSCARF Y23336 (Mat  $\alpha/a$ ; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; lys2D0/LYS2; MET15/met15D0; ura3D0/ura3D0; YBR196c::kanMX4/YBR196c). La cepa se transforma entonces mediante plásmido pRSGK-GRE2p (ejemplo 8) y después se realiza la delección del gen ZTA1 utilizando la técnica descrita en el ejemplo 9.

La cepa obtenida *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PGI1) pRSGK-GRE2p] se cultiva entonces en un medio mínimo que contiene glucosa y etilacetoacetato.

La cepa control *S. cerevisiae* [pRSGK-GRE2p] se cultiva en las mismas condiciones.

Cuando los cultivos han terminado, se compara:

- la evolución de la biomasa de cada una de las cepas durante la fase de bioconversión,
- la cantidad de etil-3-hidroxiacetato producido en el medio extracelular,
- la cantidad de etil-3-hidroxiacetato acumulado en las células,
- la productividad en etil-3-hidroxiacetato,
- el rendimiento glucosa/etil-3-hidroxiacetato.

Se podrá observar que la cepa *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PGI1) pRSGK-GRE2p] presenta un rendimiento de producción de etil-3-hidroxiacetato aumentado con relación a la cepa no optimizada.

**Ejemplo 11: Construcción de la cepa *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) pRSGK-GRE2p] y biotransformación del etilacetoacetato en etil-3-hidroxiacetato**

Los genes PFK1 y PFK2 son suprimidos en la cepa *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1)] utilizando la técnica descrita en el ejemplo 9, y los oligonucleótidos siguientes:

Dpfk1F  
ATGCAATCTCAAGATTCATGCTACGGTGTTCATTGATCAGATCTATCATCACAAATGATGAAAAGCTTCGTACGCTGC  
AGGTCCG

Dpfk1R  
TTTGTTTTTCAGCGGCTAAAGCGGCTACCTCAGCTCTCAACTTTAATCTACCGGACAGGATGGGCCACTAGTGGAT  
CTGATATC

Pfk1 int F  
GCTTTCTTAGAAGCTACCTCCG

Pfk1 int R  
GAACCGACAAGACCAACAATGG

Pfk2 int F  
CAGTTGTACACTTTGGACCC

Pfk2 intR  
GATCAGCACCAGTCAAAGAACC

La cepa se transforma entonces mediante el plásmido pRSGK-GRE2p (ejemplo 8).

La cepa obtenida *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) pRSGK-GRE2p] se cultiva entonces en un medio mínimo que contiene glucosa y etilacetoacetato.

La cepa control *S. cerevisiae* [pRSGK-GRE2p] se cultiva en las mismas condiciones.

Cuando los cultivos han terminado, se compara:

- la evolución de la biomasa de cada una de las cepas durante la fase de bioconversión,
- la cantidad de etil-3-hidroxiacetato producido en el medio extracelular,
- la cantidad de etil-3-hidroxiacetato acumulado en las células,
- la productividad en etil-3-hidroxiacetato,
- el rendimiento glucosa/etil-3-hidroxiacetato.

Se podrá observar que la cepa *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) pRSGK-GRE2p] presenta un rendimiento de

producción de etil-3-hidroxibutirato aumentado con relación a la cepa no optimizada.

	mol <sub>EB</sub> /mol <sub>Glucosa</sub>
<i>S. cerevisiae</i> [pRSGK-GRE2p]	en curso
<i>S. cerevisiae</i> [ $\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) pRSGK-GRE2p]	en curso

**Ejemplo 12: Comparación entre los valores experimentales y las predicciones mediante el modelo metabólico para la optimización de la producción de etil-3-hidroxibutirato por *Escherichia coli***

Se podrá observar una buena correlación entre las modelizaciones predictivas (ejemplo 1) y las realizaciones experimentales descritas en los ejemplos 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 11.

Los ejemplos 1 a 11 anteriores son unas aplicaciones particulares de la patente y no limitan su utilización. El experto en la técnica sabrá adaptar fácilmente estos ejemplos para la biotransformación de moléculas que tienen una síntesis NADPH-dependiente. El a través de la optimización del ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> está validado; esto permite además reivindicar una aplicación ampliada a todas las biotransformaciones NADPH-dependientes, que podrán ser modelizadas y previstas por MetOpt® o uno de sus derivados, utilizando *E. coli*, *S. cerevisiae* o cualquier otro microorganismo.

**Ejemplo 13: Cálculo de los rendimientos óptimos teóricos en el ámbito de procedimientos de fermentación en *E. coli***

El ejemplo 12 muestra que los modelos MetOpt® desarrollados por la compañía se pueden aplicar a las bioconversiones y deberían aplicarse más generalmente a las biotransformaciones tales como las fermentaciones.

A título de ejemplo, el modelo MetOpt®-Coli se aplica a la producción de cisteína o de 3-hidroxipropionato mediante fermentación de la glucosa en unas cepas de *E. coli* optimizadas según la invención. Los parámetros utilizados son los mismos que en el ejemplo 1, a saber: 1) un flujo de importación de glucosa a 3 mmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, 2) un porcentaje de crecimiento variable de 0, 0,15 y 0,25 h<sup>-1</sup>, 3) un flujo de la transhidrogenasa membranaria (*pntAB*) variable e inferior o igual a 1 mmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. El valor límite de flujo de la transhidrogenasa membranaria se determina a partir de la bibliografía (Hanson, 1979; Anderlund *et al.*, 1999; Emmerling *et al.*, 2002); 4) El flujo de mantenimiento ha sido limitado entre 5 y 22 mmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

a) caso de la producción de cisteína mediante fermentación de la glucosa

	$\mu = 0$	$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pgi</i> )	0,66	0,37	0,09
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pgi</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente	0,78	0,37	0,09
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pgi</i> ) <i>lpd</i> -NADP dependiente	0,78	0,37	0,09
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pgi</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente <i>lpd</i> -NADP dependiente	0,78	0,37	0,09
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pfkA, pfkB</i> )	0,40	0,18	0,01
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pfkA, pfkB</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente	0,62	0,30	0,06
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pfkA, pfkB</i> ) <i>lpd</i> -NADP dependiente	0,71	0,36	0,13
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pfkA, pfkB</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente <i>lpd</i> -NADP dependiente	0,77	0,42	0,17

**Rendimientos óptimos teóricos de producción de la cisteína mediante unas cepas de *E. coli* optimizadas en su capacidad de reducción del NADP<sup>+</sup> (mol por mol de glucosa)**

Con el fin de mejorar aún más el rendimiento óptimo teórico de las cepas optimizadas según la invención, se pueden tener en cuenta unas modificaciones suplementarias, tales como la sobreexpresión de por lo menos un gen seleccionado de entre *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* e *icd* y/o la delección de por lo menos un gen seleccionado de entre *edd*, *aceA*, *aceB* y *aceK*.

En la práctica, para obtener dichos rendimientos, otras modificaciones deberán ser aportadas a las cepas optimizadas según la invención, por ejemplo sobreexpresando el gen *cysB* tal como se ha descrito en la patente WO0127307, o modificando el gen *cysE* tal como se ha descrito en la patente EP 0 885 962.

b) caso de la producción de 3-hidroxipropionato mediante fermentación de la glucosa

La producción de 3-hidroxipropionato se realiza en unas cepas de *E. coli* que contiene los genes que codifican para las enzimas de la vía de síntesis del 3-hidroxipropionato, por ejemplo la malonil-coA reductasa de *Chloroflexus aurantiacus* (Hügler *et al.*, Journal of Bacteriology, 2002, 184: 2404-2410).



	$\mu = 0$	$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pgi</i> )	1,33	0,79	0,30
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pgi</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente	1,76	0,99	0,30
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pgi</i> ) <i>lpd</i> -NADP dependiente	1,82	0,99	0,30
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pgi</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente <i>lpd</i> -NADP dependiente	1,82	0,99	0,30
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pfkA, pfkB</i> )	1,62	0,66	0,03
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pfkA, pfkB</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente	1,76	0,79	0,07
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pfkA, pfkB</i> ) <i>lpd</i> -NADP dependiente	1,79	0,84	0,07
$\Delta$ ( <i>udhA, qor, pfkA, pfkB</i> ) <i>gapA</i> -NADP dependiente <i>lpd</i> -NADP dependiente	1,79	0,84	0,07

**Rendimientos óptimos teóricos de producción de 3-hidroxipropionato mediante unas cepas de *E. coli* optimizados en su capacidad de reducción del NADP<sup>+</sup> (mol por mol de glucosa)**

5 Con el fin de mejorar aún más el rendimiento óptimo teórico de las cepas optimizadas según la invención, se pueden tener en cuenta unas modificaciones suplementarias, tales como la sobreexpresión de por lo menos un gen seleccionado de entre *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* e *icd* y/o la delección de por lo menos un gen seleccionado de entre *edd*, *aceA*, *aceB* y *aceK*.

10 **Ejemplo 14: Cálculo de los rendimientos óptimos teóricos en el marco de procedimientos de fermentación en *S. cerevisiae*; aplicación a la producción de hidrocortisona**

El ejemplo 12 muestra que los modelos MetOpt® desarrollados por la compañía se pueden aplicar a las bioconversiones y deberían aplicarse más generalmente a las biotransformaciones tales como las fermentaciones.

15 A título de ejemplo, el modelo MetOpt®-Coli se aplica a la producción de hidrocortisona mediante fermentación de la glucosa en unas cepas de *S. cerevisiae* optimizadas según la invención. Los parámetros utilizados son los mismos que en el ejemplo 1, a saber: 1) un flujo de importación de glucosa a 3 mmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, 2), un porcentaje de crecimiento variable de 0, 0,15 y 0,25 h<sup>-1</sup>, 3), un flujo de de mantenimiento inferior o igual a 22 mmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>; 4) las reacciones de los aldehídos deshidrogenasas (ALD2, ALD3, ALD&) son irreversibles e impuestas en el sentido acetato + NAD(P)H -> acetaldehído + NAD(P); 5) la levadura no posee ninguna actividad equivalente a *udjA* o *pntA,B*.

El modelo permite tener en cuenta la compartimentación mitocondrial y peroxisomal.

25 Esta representación de los resultados permite demostrar la aportación real de cada una de las mutaciones aportadas según la invención, en la mejora de la producción de NADPH y por lo tanto en la mejora del flujo de producción de hidrocortisona.

30 La producción de hidrocortisona se lleva a cabo en unas cepas de *S. cerevisiae* que contienen los genes que codifican para las enzimas de la vía de síntesis de la hidrocortisona (Szczebara *et al.*, 2003, Nature Biotechnology, 21: 143-149).

	$\mu = 0$	$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
$\Delta$ (ZTA1,PGI1)	0,12	0,08	0,06
$\Delta$ (ZTA1,PGI1) TDH1,2,3-NADP dependiente	0,21	0,14	0,10
$\Delta$ (ZTA1,PGI1) LPD1-NADP dependiente	0,20	0,14	0,10
$\Delta$ (ZTA1,PGI1)TDH1,2,3-NADP dependiente LPD1-NADP dependiente	0,21	0,14	0,10

35 **Rendimientos óptimos teóricos de producción de hidrocortisona por unas cepas de *S. cerevisiae* optimizadas en su capacidad de reducción del NADP<sup>+</sup> (mol por mol de glucosa)**

40 Las cepas de las cuales se suprimen los genes PFK1 y PFK2 son incapaces de producir la hidrocortisona, incluso no son viables. Esto se debe al hecho de que la producción de hidrocortisona está más limitada por la demanda en carbono que por la necesidad en NADPH. Una solución consiste en permitir una ligera expresión de una actividad de tipo transhidrogenasas en la levadura. Sin embargo, las modelizaciones muestran que el flujo de producción de hidrocortisona no será nunca tan bueno como en el caso de una delección del gen PGI1.

45 Con el fin de mejorar aún más el rendimiento óptimo teórico de las cepas optimizadas según la invención, se pueden tener en cuenta unas modificaciones suplementarias, tales como la sobreexpresión de por lo menos un gen seleccionado de entre ZWF, SOL1, SOL2, SOL3, SOL4, GND1, GND2, EDP1, IDP2 e IDP3 y/o la delección de por lo menos un gen seleccionado de entre ICL1, DAL7.

**Referencias**

50 • Anderson, E.H. (1946) Growth requirements of virus-resistant mutants of Escherichia coli strain "B", *Proc. Natl.*

*Acad. Sci. USA* 32:120-128

- 5 • Baudin, A.; Ozier-Kalogeropoulos, O.; Denouel, A.; Lacroute, F. y Cullin, C. (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucl. Acids Res.* 21, 3329-3330
- Bocanegra, J.A. Scrutton, N.S.; Perham, R.N. (1993) Création of an NADP-dependent pyruvate dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. *Biochemistry* 32: 2737-2740
- 10 • Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.* 14:115-32.
- Datsenko, K.A.; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640-6645
- 15 • Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York
- Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Nueva York
- 20 • Schaefer U.; Boos, W.; Takors, R.; Weuster-Botz, D. (1999) Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics., *Anal. Biochem.* 270: 88-96
- 25 • Wach, A.; Brachat, A.; Pohlmann, R.; y Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 10, 1793-1808, 1994.

**Listado de secuencias**

30 <110> METABOLIC EXPLORER

<120> Cepas de microorganismos optimizadas para vías de biosíntesis consumidoras de NADPH

35 <130> D21726

<150> FR 0313056

<151> 2003-11-06

40 <160> 38

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 100

45 <212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

<400> 1

ggtgcgcgcg tcgcagttat cgagcgttat caaaatgttg gcggcggttg cacccactgg 60

50 ggcaccatcc cgtcgaagc catatgaata tctccttag 100

<210> 2

<211> 100

<212> ADN

55 <213> oligonucleótido sintético

<400> 2

cccagaatct cttttgtttc ccgatggaac aaaattttca gcgtgcccac gttcatgccg 60

60 acgattttgtg cgcgtgccag tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 3

<211> 30

# ES 2 371 648 T3

	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 3	
5	ggccgctcag gatatagcca gataaatgac	30
	<210> 4	
	<211> 30	
10	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 4	
15	gcgggatcac ttactgcca gcgctggctg	30
	<210> 5	
	<211> 100	
	<212> ADN	
20	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 5	
25	ggtggcccg aagtactca agccgtagag ttactcctg ccgatccggc ggagaatgaa atccaggtcg aaaataaagc catatgaata tcctccttag	60 100
	<210> 6	
	<211> 100	
	<212> ADN	
30	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 6	
35	cgcccggctt tccagaatct catgcgacg ctgcgcatcc ttcagcggat atttctgctg ctcggcgaca tcgacctaa tgtaggctgg agctgcttcg	60 100
	<210> 7	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 7	
45	cgccaacac cgactgctcc gcttcgatcg	30
	<210> 8	
	<211> 30	
	<212> ADN	
50	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
	cagcgttatg accgctggcg ttactaaggg	30
55	<210> 9	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
60	<400> 9	
	acgtacgtgg catatgcag tttcgttc agtgctaac ggg	43
	<210> 10	
65	<211> 44	
	<212> ADN	

# ES 2 371 648 T3

	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 10	
5	acgtacctgc agttatattc tgcctcaaa tttaaaatt tggg	44
	<210> 11	
	<211> 100	
	<212> ADN	
10	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 11	
15	ccaacgcaga ccgctgcctg gcaggcacta cagaacact tcgatgaaat gaaagacgtt	60
	acgatcgccg atcttttgc tgtaggctgg agctgctcg	100
	<210> 12	
	<211> 100	
	<212> ADN	
20	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 12	
25	gcgccacgct ttatagcggg taatcagacc attggtcgag ctatcgtggc tgctgatttc	60
	ttatcatct ttcagctctg catatgaata tcctccttag	100
	<210> 13	
	<211> 30	
	<212> ADN	
30	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 13	
35	gcggggcggg tgtaacgat ggggtcatgc	30
	<210> 14	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
40	<400> 14	
	cggtatgatt tccgttaaat tacagacaag	30
45	<210> 15	
	<211> 102	
	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
50	<400> 15	
	cgcgcgagac tcgctctgct tatctgccc ggatagaaca agcgaaaact tcgaccgttc	60
	atcgttcgca gttgcatgc ggtgtaggct ggagctgctt cg	102
55	<210> 16	
	<211> 98	
	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
60	<400> 16	
	cgcaaggcgc tgaataattc acgtcctgtt cccacgcgtg acgcgctcag gtcaggaatg	60
	tgcggttcgc gagcagccca tatgaatatc ctcccttag	98
65	<210> 17	
	<211> 29	

# ES 2 371 648 T3

	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
5	gggtagactc cactactgag gcgtagggcg	29
	<210> 18	
	<211> 24	
10	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 18	
15	ccccggaatc agaggaatag tccc	24
	<210> 19	
	<211> 100	
	<212> ADN	
20	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 19	
25	gggtgttga caagcggcgg tgatgcgcca ggcataaacg ccgcaattcg cggggttgtt cgttctgcbc tgacagaagg tgtaggctgg agctgctcg	60 100
	<210> 20	
	<211> .100	
	<212> ADN	
30	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 20	
35	ttcgcgcagt ccagccagtc accttgaac ggacgcttca tgtttcgat agcgtcgatg atgctgtggt gaaccagctg catatgaata tcctccttag	60 100
	<210> 21	
	<211> 27	
	<212> ADN	
40	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 21	
45	cgcacgcggc agtcagggcc gacccgc	27
	<210> 22	
	<211> 27	
	<212> ADN	
50	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 22	
	ccctacgccc cactgttca tcgcccg	27
55	<210> 23	
	<211> 99	
	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
60	<400> 23	
	gccccctctc tcgatagcgc aacaattacc ccgcaaattt atcccgaagg aaaactgcgc tgtaccgcac cgggtgtcgt gtaggctgga gctgctcg	60 99
65	<210> 24	
	<211> 100	

ES 2 371 648 T3

	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 24	
5	gcgggaaagg taagcgtaa tttttgcgt atcgatcagg gagcacagac gtgtccctg attgagtgtg gctgcactcc catatgaata tctccttag	60 100
	<210> 25	
10	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 25	
15	tggcaggatc atccatgaca gtaaaaacgg	30
	<210> 26	
	<211> 26	
20	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 26	
25	gccggttgca cttgggtaa gccccg	2 6
	<210> 27	
	<211> 43	
	<212> ADN	
30	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 27	
	acgtacgtcc cccgggaaaa atgtcagttt tcgttcagg tgc	4 3
35	<210> 28	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
40	<400> 28	
	acgtacgggc cttatattc tgcctcaaa ttttaaatt tggg	44
45	<210> 29	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
50	<400> 29	
	ccaacgcaga ccgctgcctg gcaggcacta cagaacact tcgatgaaat gaagacggt acgatcgccg atcttttgc ttaggctgg agctgctcg	60 100
55	<210> 30	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
60	<400> 30	
	gcccacgct ttagcggg taatcagacc attggtcag ctatcgtggc tgcgtattc ttatcatct ttcagctcg catatgaata tctccttag	60 100
65	<210> 31	
	<211> 30	

# ES 2 371 648 T3

	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 31	
5	gcggggcggg tgcaacgat ggggtcatgc	30
	<210> 32	
	<211> 30	
10	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 32	
15	cggtatgatt tccgtaaatacagacaag	30
	<210> 33	
	<211> 82	
	<212> ADN	
20	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 33	
25	atgcaatctc aagattcatg ctacgggtgt gcattcagat ctatcatcac aaatgatgaa aagcttcgta cgctgcaggt cg	60 82
	<210> 34	
	<211> 83	
	<212> ADN	
30	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 34	
35	ttgttttca gcggctaaag cggtacctc agctctcaac ttaatctac cggacaggat ggccactag tgatctgat atc	60 83
	<210> 35	
	<211> 22	
	<212> ADN	
40	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 35	
45	gctttcttag aagctacctc cg	22
	<210> 36	
	<211> 22	
	<212> ADN	
50	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 36	
	gaaccgacaa gaccaacaat gg	22
55	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> oligonucleótido sintético	
60	<400> 37	
	cagttgtaca cttggaccc	20
	<210> 38	
65	<211> 22	
	<212> ADN	

# ES 2 371 648 T3

<213> oligonucleótido sintético

<400> 38

5 gatcagcacc agtcaaagaa cc

22



## REIVINDICACIONES

1. Cepa de microorganismo, caracterizada porque comprende la limitación de una o varias actividad(es) que oxidan el NADPH mediante la delección de uno o varios gen(es) que codifican para una quinona oxidoreductasa y/o una transhidrogenasa soluble, y porque comprende asimismo unas modificaciones que permiten favorecer una o varias actividad(es) enzimática(s) que reducen el NADP<sup>+</sup> mediante la delección de uno o varios gen(es) que codifican para una fosfoglucosa isomerasa y/o una fosfofructoquinasa.
2. Cepa según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende asimismo la modificación de uno o varios gen(es) que codifican para una dihidrolipoamida deshidrogenasa y/o una gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, con el fin de que utilice(n) preferentemente el NADP.
3. Cepa según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque comprende asimismo la sobreexpresión de uno o varios gen(es) que codifican para una glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, una 6-fosfogluconolactonasa, una 6-fosfogluconato deshidrogenasa, una isocitrato deshidrogenasa o una transhidrogenasa membranaria.
4. Cepa según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque comprende asimismo la delección de uno o varios gen(es) que codifican para una 6-fosfogluconato deshidratasa, una malato sintasa, una isocitrato liasa o una isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa.
5. Cepa según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque comprende uno o varios genes, endógenos o exógenos, que codifican unas enzimas implicadas en la biotransformación de una molécula de interés.
6. Cepa según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque comprende uno o varios genes marcadores de selección.
7. Cepa según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque se selecciona de entre las especies siguientes: *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Penicillium sp.*, *Pichia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.* y *Candida sp.*
8. Procedimiento de preparación de las cepas optimizadas según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque se suprime uno o varios gen(es) que codifican para una quinona oxidoreductasa y/o una transhidrogenasa soluble, y se suprime uno o varios gen(es) que codifican para una fosfoglucosa isomerasa, una fosfofructoquinasa, una 6-fosfogluconato deshidratasa, una malato sintasa, una isocitrato liasa o una isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa, y/o porque se modifica uno o varios gen(es) que codifican para una dihidrolipoamida deshidrogenasa y/o una gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, con el fin de que utilice(n) preferentemente el NADP, siendo estas delecciones y modificaciones llevadas a cabo mediante un medio apropiado, y/o se sobreexpresa uno o varios gen(es) que codifican para una glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, una 6-fosfogluconolactonasa, una 6-fosfogluconato deshidrogenasa, una isocitrato deshidrogenasa o una transhidrogenasa membranaria, o bien transformando la cepa con un vector apropiado que comprende uno o varios gen(es) que codifican una o varias enzima(s) implicadas en la biotransformación de una molécula de interés y/o uno o varios gen(es) marcadores de selección, o bien modificando la fuerza del o de los promotor(es) endógeno(s) que controlan el o los gen(es) a sobreexpresar.
9. Procedimiento de producción de una molécula de interés de la cual por lo menos una de las reacciones de la vía de biosíntesis es NADPH-dependiente, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
- cultivar unos microorganismos optimizados según una de las reivindicaciones 1 a 7, en un medio de cultivo apropiado que favorece su crecimiento y que comprende las sustancias necesarias para la realización de la biotransformación mediante fermentación o biotransformación, con la excepción del NADPH, y
  - extraer la molécula de interés del medio y, llegado el caso, purificarla.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la molécula de interés se selecciona de entre los aminoácidos, las vitaminas, los esteroides, los flavonoides, los ácidos grasos, los ácidos orgánicos, los polioles y los hidroxiteres.