

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 796**

51 Int. Cl.:

C12P 17/18 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2008 E 08714246 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2109681**

54 Título: **Nuevos microorganismos para la producción de 1,2-propanodiol obtenidos mediante una combinación de evolución y diseño racional**

30 Prioridad:

23.03.2007 WO PCT/IB2007/001680

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

30.12.2014

73 Titular/es:

**METABOLIC EXPLORER (100.0%)
BIÔPOLE CLERMONT-LIMAGNE
63360 SAINT BEAUZIRE, FR**

72 Inventor/es:

**SOUCAILLE, PHILIPPE;
VOELKER, FRANCOIS y
FIGGE, RAINER**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 525 796 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

Nuevos microorganismos para la producción de 1,2-propanodiol obtenidos mediante una combinación de evolución y diseño racional.

5 La presente divulgación se refiere a un nuevo método que combina evolución y diseño racional para la preparación de un microorganismo para producir 1,2-propanodiol, el microorganismo obtenido por el mismo y su uso para la preparación de 1,2-propanodiol.

10 El 1,2-propanodiol o propilenglicol, un dialcohol C3, es un producto químico ampliamente utilizado. Es un componente de resinas de poliéster insaturadas, detergentes líquidos, refrigerantes, líquidos anticongelantes y descongelantes para aviones. Desde 1993-1994 se ha incrementado el uso del propilenglicol como sustituto de derivados del etileno, los cuales han sido reconocidos como más tóxicos que los derivados del propileno.

15 El 1,2-propanodiol se produce actualmente por medios químicos utilizando un proceso de hidratación de óxido de propileno que consume grandes cantidades de agua. El óxido de propileno puede producirse mediante dos procesos, uno utilizando epíclorhidrina, y el otro utilizando hidroperóxido. Ambas rutas utilizan sustancias altamente tóxicas. Adicionalmente, la ruta del hidroperóxido genera subproductos tales como el *tert*-butanol y el 1-feniletanol. Para que la producción de propileno resulte rentable se debe encontrar un uso para estos subproductos. Generalmente la ruta química produce 1,2-propanodiol racémico, mientras que cada uno de los dos estereoisómeros (R) 1,2-propanodiol y (S) 1,2-propanodiol es de interés para una serie de aplicaciones (por ejemplo compuestos quirales iniciales para productos químicos especiales y productos farmacéuticos).

20 Las desventajas de los procesos químicos para la producción de 1,2-propanodiol hacen que la síntesis biológica sea una alternativa atractiva. Dos rutas han sido caracterizadas para la producción natural de 1,2-propanodiol a partir de azúcares por microorganismos.

25 En la primera ruta, azúcares 6-deoxi (por ejemplo L-ramnosa o L-fucosa) se escinden en dihidroxiacetona fosfato y (S)-lacto-aldehído, que puede ser reducido más adelante a 1,2-propanodiol (Badia et al, 1985). Esta ruta es funcional en *E.coli* pero su rendimiento no permite un proceso rentable económicamente debido al elevado coste de las deoxihexosas.

30 La segunda ruta es el metabolismo de azúcares comunes (por ejemplo glucosa o xilosa) a través de la vía de la glicólisis, seguida de la vía metilglioxal. La dihidroxiacetona fosfato se convierte en metilglioxal, el cual puede ser reducido ya sea a lacto-aldehído o bien a acetol. Estos dos compuestos pueden someterse a una segunda reacción de reducción produciéndose 1,2-propanodiol. Esta ruta es muy utilizada por productores naturales de propanodiol tales como *Clostridium sphenoides* y *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*. *Clostridium sphenoides* ha sido utilizado para producir 1,2-propanodiol a títulos de 1,58 g/l en condiciones limitantes de fosfato (Tran Din and Gottschalk, 1985). *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum* también ha sido investigado para la producción de 1,2-propanodiol (Cameron and Cooney, 1986, Sanchez-Rivera et al, 1987). Los mejores resultados obtenidos fueron un título de 9 g/l y un rendimiento a partir de glucosa de 0,2 g/g. Sin embargo, la mejora de los resultados obtenidos con estos microorganismos es probable que este limitada debido a la falta de herramientas genéticas.

Antecedentes de la técnica

45 La solicitud de patente WO 2004/033646 hace referencia a modificaciones genéticas en *Escherichia coli* para mejorar la producción endógena de 1,3 propanodiol, en particular la regulación a la baja del gen *gapA*.

50 Cameron et al (1998) han investigado el uso de *E. coli* como plataforma de ingeniería metabólica para la conversión de azúcares a 1,2-propanodiol. Su análisis teórico mostró que el límite superior realista del rendimiento de producto (considerando los balances de masa y la producción de energía para el crecimiento) es significativamente diferente dependiendo de las condiciones de cultivo. Bajo condiciones anaeróbicas, el acetato se producirá como un subproducto para reciclar los cofactores reducidos y el mejor rendimiento debería limitarse a 1 mol de 1,2-propanodiol por mol de glucosa (0,42g/g). Bajo condiciones aeróbicas, el reciclaje de los cofactores debe garantizarse gracias a la cadena respiratoria utilizando oxígeno como aceptor final de electrones y podría ser posible producir 1,2-propanodiol sin la producción de productos secundarios. Bajo estas condiciones, el rendimiento podría alcanzar 1,42 mol/mol (0,6 g/g) en el mejor de los casos. En relación con el título máximo de 1,2-propanodiol, Cameron et al discuten su dependencia de la toxicidad del producto y de los subproductos. El 1,2-propanodiol es significativamente menos tóxico que el 1,3-propanodiol y *E. coli* presenta una tasa de crecimiento residual de 0,5 h⁻¹ en presencia de 100 g/l de 1,2-propanodiol. La inhibición del crecimiento es más probable que se deba al subproducto acetato, que es conocido por ser altamente inhibidor del crecimiento. El desarrollo de un proceso anaeróbico para la producción de 1,2-propanodiol con títulos y rendimientos altos tendrá que abordar el problema del acetato. Se ha propuesto la conversión de acetato en acetona, que es menos inhibidora y se elimina fácilmente *in situ* (WO 2005/073364).

65

Varias investigaciones sobre modificaciones genéticas de *E. coli* para obtener un productor de 1,2-propanodiol que utilice fuentes de carbono simples han sido realizadas por el grupo de Cameron (Cameron et al, 1998, Altaras and Cameron, 1999, Altaras and Cameron, 2000) y por el grupo de Bennett (Huang et al, 1999, Berrios-Rivera et al, 2003). Estos estudios se basan, por un lado, en la expresión de una o varias actividades enzimáticas de la ruta de dihidroxiacetona fosfato a 1,2-propanodiol y, por otro lado, en la eliminación de rutas consumidoras de NADH y de carbono en la cepa huésped. Los mejores resultados obtenidos por el grupo de Cameron son la producción de 1,4 g/l de 1,2-propanodiol en cultivo anaeróbico en frascos con un rendimiento de 0,2 g/ g de glucosa consumida. Extrapolada a un fermentador de lote alimentado (del inglés fed-batch) anaeróbico, la producción fue de 4,5 g/l de 1,2-propanodiol con un rendimiento de 0,19 g/ g de glucosa, lejos de la evaluación teórica de Cameron et al. Estos resultados se obtuvieron con la sobreexpresión del gen de la metilglicoxal sintasa de *E. coli* (*mgs*), el gen de la glicerol deshidrogenasa de *E. coli* (*gldA*) y el gen de la 1,2-propanodiol oxidoreductasa de *E. coli* (*fucO*) en una cepa careciente del gen que codifica para la lactato deshidrogenasa (*ldhA*). Los resultados obtenidos mediante el mismo enfoque pero con títulos y rendimientos más bajos también están descritos en las patentes US 6.087.140, US 6.303.352, y WO 98/37204.

El grupo de Bennett también utilizó una cepa huésped de *E. coli* careciente de *ldhA* para la sobreexpresión del gen *mgs* de *Clostridium acetobutylicum* y del gen *gldA* de *E. coli*. Cultivos en frasco bajo condiciones anaeróbicas dieron un título de 1,3 g/l y un rendimiento de 0,12 g/g mientras que cultivos microaeróbicos dieron un título de 1,4 g/l y un rendimiento de 0,13 g/g.

Un método alternativo para obtener una cepa productora de 1,2-propanodiol consiste en dirigir la evolución de una "cepa inicial" hacia un estado en el que la "cepa evolucionada" produce el compuesto deseado con mejores características. Este método se basa en la evolución natural de un microorganismo que se modifica inicialmente mediante la atenuación de dos genes, el *tpiA* y un gen involucrado en la conversión de metilglicoxal en lactato. El objetivo de atenuar el gen *tpiA* que codifica para la triosa fosfato isomerasa es separar las dos ramas metabólicas que empiezan en el gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), compuestos que normalmente se interconvierten entre sí gracias a esta enzima. La ruta de la DHAP al 1,2-propanodiol será la "rama reductora" que consumirá cofactores reducidos (NADH), mientras que el metabolismo de GA3P a acetato será la "rama oxidativa", produciendo NADH y energía para el crecimiento celular. Sin un gen *tpiA* funcional, el metabolismo de la célula está "bloqueado" y el crecimiento de la cepa, la producción de 1,2-propanodiol y la producción de acetato están estrechamente acoplados. Bajo presión selectiva en un medio de crecimiento apropiado, esta cepa inicial evolucionará a un estado en el que la producción de 1,2-propanodiol por la misma habrá mejorado. Este procedimiento para obtener una "cepa evolucionada" de un microorganismo para la producción de 1,2-propanodiol está descrito en la solicitud de patente WO 2005/073364. Este proceso de evolución y la siguiente etapa de fermentación se desarrollan preferentemente bajo condiciones anaeróbicas. Esta tecnología es una clara mejora respecto del estado de la técnica. Se obtuvo un título de 1,2-propanodiol de 1,8 g/l con un rendimiento de 0,35 gramos por gramo de glucosa consumida, cercano al resultado teórico de Cameron et al..

El objeto de la presente invención es la mejora de una cepa productora de 1,2-propanodiol mediante evolución y subsiguiente ingeniería genética racional de la cepa evolucionada. Una característica especial es la reconstrucción de un gen *tpiA* funcional en la cepa evolucionada *tpiA* menos. Estas modificaciones conducen a una producción mejorada de 1,2-propanodiol.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo método que combina evolución y diseño racional para la preparación de una cepa de un microorganismo para la producción de 1,2-propanodiol a partir de una fuente de carbono. Dicho método comprende:

- El crecimiento de una cepa inicial bajo presión selectiva en un medio de crecimiento apropiado, dicha cepa bacteriana comprendiendo una atenuación de la expresión del gen *tpiA* y una atenuación de la expresión de al menos uno de los genes involucrados en la conversión de metilglicoxal a lactato (como *gloA*, *adlA*, *aldB*), con el objetivo de promover la evolución en dicha cepa inicial,
- la selección y el aislamiento de la cepa evolucionada que tenga una tasa de producción de 1,2-propanodiol incrementada (incrementada al menos de 20%),
- la reconstrucción de un gen *tpiA* funcional en la cepa evolucionada;

En un aspecto de la invención, la síntesis de subproductos no deseados se atenúa mediante la delección de genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de lactato a partir de piruvato (*ldhA*), formato (*pflA*, *pflB*), etanol (*adhE*). En otro aspecto de la invención, la ruta de Entner-Doudoroff se elimina mediante la delección del gen *edd* o del gen *eda*, o de ambos. Ventajosamente, al menos uno de los genes, seleccionado de *arcA* y *ndh* se atenúa con el objetivo de hacer que más NADH esté disponible para las etapas de reducción en la ruta biosintética del 1,2-propanodiol.

El microorganismo utilizado para la preparación de 1,2-propanodiol se selecciona entre bacterias, levaduras y hongos, pero es preferentemente de las especies *Escherichia coli* o *Clostridium acetobutylicum*.

La presente divulgación también se refiere a la cepa evolucionada tal y como la que se obtiene, que además, puede ser modificada genéticamente con el objetivo de optimizar la conversión de una fuente de carbono a 1,2-propanodiol sin subproductos y con el mejor rendimiento posible. En un aspecto de la divulgación la actividad de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa se reduce con el objetivo de redirigir una parte del gliceraldehído 3 fosfato disponible hacia la síntesis de 1,2-propanodiol. En otro aspecto de la divulgación, la eficiencia de la importación de azúcar se incrementa, ya sea utilizando un sistema de importación de azúcar independiente de fosfoenolpiruvato (PEP) como el que esta codificado por *galP*, o bien proporcionando más PEP al sistema azúcar-fosfotransferasa. Esto se obtiene mediante la eliminación de las rutas que consumen PEP como las piruvato quinazas (codificadas por los genes *pykA* y *pykF*) y/o mediante el fomento de la síntesis de PEP por ejemplo sobreexpresando el gen *ppsA* que codifica para la PEP sintasa. Adicionalmente, es valioso para la enzima que convierte el piruvato en acetil-coA el que sea resistente a las altas concentraciones de NADH que se encuentran en condiciones anaeróbicas. Esto puede obtenerse mediante una mutación específica del gen *lpd*. Ventajosamente, la síntesis del subproducto acetato se previene mediante la atenuación de uno o varios de los genes *ackA*, *pta*, *poxB*.

Esta divulgación también se refiere a un método para la producción de 1,2-propanodiol con un rendimiento óptimo, bajo condiciones anaeróbicas, microaeróbicas o aeróbicas, utilizando la dicha cepa de *E. coli* evolucionada y opcionalmente modificada genéticamente, crecida en un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente de carbono simple. Adicionalmente, la divulgación se refiere a un método para la producción de 1,2-propanodiol con un rendimiento óptimo, bajo condiciones anaeróbicas, utilizando dicha cepa de *C. acetobutylicum* evolucionada y opcionalmente modificada genéticamente, crecida en un medio de crecimiento apropiado que contiene un fuente de carbono simple o compleja. El 1,2-propanodiol producido de acuerdo con este método es subsiguientemente recuperado y opcionalmente purificado.

Breve descripción de las figuras

La figura que acompaña ejemplifica la invención y, juntamente con la descripción, sirve para explicar los principios de esta invención.

La Figura 1 representa la ingeniería genética del metabolismo central en el desarrollo de un sistema de producción de 1,2-propanodiol a partir de carbohidratos.

Descripción detallada de la invención

De la forma en que se utilizan a continuación, los siguientes términos pueden ser utilizados para la interpretación de las reivindicaciones y de la especificación.

El término “cepa” hace referencia a una variante genética de una especie. Así, el termino “cepa de un microorganismo” hace referencia a un variante genética de una especie de un microorganismo específico. Las características atribuidas a cualquier cepa se aplican también para el correspondiente microorganismo o viceversa.

De acuerdo con la invención, los términos “cultivo”, “crecimiento” y “fermentación” se usan de forma intercambiable para hacer referencia al crecimiento de la bacteria en un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente de carbono simple.

De acuerdo con la presente invención, el término “fuente de carbono” hace referencia a cualquier fuente de carbono que pueda ser utilizada por aquellos expertos en la materia para sustentar el crecimiento normal de un microorganismo, y que puede ser hexosas, pentosas, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, almidón o sus derivados, hemicelulosas, glicerol y combinaciones de las anteriores.

De acuerdo con la invención, el término “medio de crecimiento apropiado” hace referencia a un medio de composición molecular conocida, adaptada al crecimiento del microorganismo y diseñado de tal forma que promueva la evolución deseada.

De acuerdo con la invención, el proceso de evolución es un proceso de preparación de microorganismos evolucionados que presentan características de producción mejoradas, y comprende las siguientes etapas:

- a) Modificación de un microorganismo para obtener un cepa inicial con un metabolismo “bloqueado” en el que la evolución solamente puede tomar la dirección deseada cuando las células de la cepa inicial crecen en el medio apropiado,
- b) Crecimiento de la cepa inicial obtenida anteriormente en dicho medio apropiado con el objetivo de provocar su evolución, en la que la cepa inicial crece bajo condiciones anaeróbicas, microaeróbicas o aeróbicas,

- c) Selección de las “cepas evolucionadas” capaces de crecer bajo estas condiciones específicas, que presenten características de producción mejoradas para el compuesto de interés.

5 Este proceso de evolución ha sido extensivamente descrito en las solicitudes de patente WO 2004/076659 presentada el 17/02/2004, y WO 2005/073364 presentada en 12/01/2005, por los mismos solicitantes.

10 De acuerdo con la invención, el término “selección” hace referencia a un proceso en el que solamente las cepas de microorganismos que permanecen en el medio de cultivo son aquellas que presentan mejor adecuación bajo condiciones de presión selectiva. Típicamente, las cepas más aptas superan a sus competidores y son seleccionadas. Una forma simple de seleccionar una cepa evolucionada específica de un microorganismo en una población consiste en hacer crecer esta población en un cultivo continuo en el que las cepas que crecen lentamente son eluidas a lo largo del cultivo. Este no es un ejemplo exclusivo de selección, y otros métodos de selección conocidos por el experto en la materia podrían aplicarse.

15 El término “aislamiento” hace referencia a un proceso en el que una cepa individual que presenta modificaciones genéticas específicas se separa de una población de cepas que presentan diferentes características genéticas. Esto se lleva a cabo muestreando la biomasa después del periodo de evolución y repartiéndola en placas de Petri para aislar colonias individuales.

20 El término “tasa de producción de 1,2-propanodiol” significa una tasa de producción expresada en g/l/h, que se calcula de la siguiente manera:

Concentración de 1,2-propanodiol producido en el medio (g/l) / tiempo necesario para esta producción (hora)

25 Adicionalmente, una tasa de producción específica expresada en g/g/h, teniendo en cuenta la biomasa puede calcularse de la siguiente forma:

Concentración de 1,2-propanodiol producido en el medio (g/l) / concentración de biomasa producida en el medio (g/l) / tiempo necesario para estas producciones (h)

30 La concentración de biomasa se determina ya sea midiendo la absorbancia del caldo de fermentación con un espectrofotómetro haciendo una lectura por ejemplo a 600 nm, o bien determinando el peso seco de células después de secar un determinado volumen de caldo de fermentación.

35 La cantidad de 1,2-propanodiol producido se mide mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (del inglés High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) con una columna adaptada de acuerdo con un protocolo acorde al estado de la técnica.

40 En la presente invención, las cepas evolucionadas se seleccionan para las siguientes características: una tasa de incorporación de glucosa incrementada y una tasa de producción de 1,2-propanodiol mejorada. Las cepas que muestran estas características se aíslan, y se comparan unas con otras, de forma que se pueda identificar al mejor productor.

45 La tasa de incorporación de glucosa, expresada en g/l/h se calcula de la siguiente manera:

Concentración de glucosa consumida por el cultivo (g/l) / tiempo necesario para este consumo (h)

50 Un tasa de incorporación de glucosa específica puede calcularse teniendo en cuenta la concentración de biomasa tal y como se ha descrito anteriormente.

La tasa de incorporación de glucosa y la tasa de producción de 1,2-propanodiol están íntimamente relacionadas. Si el consumo de glucosa se incrementa, la producción de los productos a partir del metabolismo de la glucosa se incrementa en la misma proporción.

55 Después de la selección y el aislamiento, las mejores cepas evolucionadas presentan una tasa de incorporación de glucosa que es aproximadamente un 20% superior que la tasa de incorporación de la cepa inicial, preferentemente un 30% superior o más, y más preferentemente aproximadamente 50% superior o más.

60 La tasa de producción de 1,2-propanodiol incrementada es aproximadamente un 20% superior a la tasa de producción de la cepa inicial, preferentemente un 30% superior o más, y más preferentemente aproximadamente 50% superior o más.

65 El gen *tpiA* codifica para la enzima “triosa fosfato isomerasa”, que cataliza la interconversión de DHAP y GA3P (ver Figura 1). El objetivo de la atenuación de este gen es el de remodelar el metabolismo de la célula de tal manera que se posibilite la evolución hacia una producción más eficiente de 1,2-propanodiol.

De acuerdo con la invención, el término “atenuación de la expresión de un gen” hace referencia a la supresión parcial o completa de la expresión de un gen, el cual pasa a denominarse “atenuado”. Esta supresión de la expresión puede ser una inhibición de la expresión del gen, una supresión de un mecanismo de activación del gen, una delección de toda o de parte de la región promotora necesaria para la expresión del gen o una delección en la región codificante del gen. Preferentemente, la atenuación de un gen es esencialmente la delección completa de este gen, gen que puede ser remplazado por un gen marcador de selección que facilite la identificación, el aislamiento y la purificación de las cepas de acuerdo con la invención. Un gen se desactiva preferentemente mediante la técnica de recombinación homóloga tal y como se describe en Datsenko, K.A. & Warner, 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. Otros métodos se describen a continuación.

El término “expresión” hace referencia a la transcripción y la traducción de una secuencia génica que provoca la generación de la proteína correspondiente, producto del gen.

El término “reconstrucción de un gen *tpiA* funcional en la cepa evolucionada” significa que la cepa evolucionada seleccionada se modifica después del proceso de evolución introduciéndole un gen *tpiA* funcional; esto puede lograrse mediante la sustitución de la copia atenuada por una copia salvaje (del inglés wild-type) funcional mediante recombinación homóloga, restaurando así una actividad triosa fosfato isomerasa similar a la actividad medida en la cepa inicial, o bien mediante la introducción de un gen *tpiA* funcional en un locus cromosómico diferente, o mediante la introducción de un gen *tpiA* funcional en un plásmido. Esta restauración puede permitir una producción de 1,2-propanodiol con un rendimiento superior a 1 mol/mol gracias al reciclado parcial de GA3P a DHAP para la producción de 1,2-propanodiol a través de la acción de la triosa fosfato isomerasa.

El objetivo de la atenuación de la expresión de al menos un gen involucrado en la conversión de metilglioxal (2-oxo propanal) en lactato es inhibir la conversión de metilglioxal a lactato, de tal forma que el metilglioxal presente sea utilizado por la maquinaria celular esencialmente para la síntesis de 1,2-propanodiol.

Genes involucrados en la conversión de metilglioxal en lactato son particularmente:

- un gen que codifica para la glioxilasa, por ejemplo el gen *gloA* que codifica para la glioxilasa I; que cataliza la síntesis de lactoil-glutatión a partir de metilglioxal.
- Los genes *aldA* y *aldB* que codifican para una lacto-aldehído deshidrogenasa (que cataliza la síntesis de (S) lactato a partir de (S) lacto-aldehído).

Ventajosamente, la expresión de uno o más de estos genes se atenúa (o se elimina completamente el gen) en la cepa inicial. Preferentemente se elimina el gen *gloA*.

Ventajosamente, en la cepa inicial se realiza una modificación adicional que consiste en suprimir las rutas naturales de fermentación natural de glucosa, que consume equivalentes reductores como el NADH y por lo tanto compite con la ruta de biosíntesis de 1,2-propanodiol.

En particular, es ventajoso atenuar la expresión del gen *ldhA* que codifica para la lactato deshidrogenasa que cataliza la síntesis de lactato a partir de piruvato, y la expresión del gen *adhE* que codifica para la alcohol-aldehído deshidrogenasa que cataliza la síntesis de etanol a partir de acetil-coA.

De forma similar, es posible forzar al microorganismo a usar el complejo piruvato deshidrogenasa para producir acetil-coA y NADH a partir de piruvato. Esto puede lograrse atenuando la expresión de los genes *pfIA* y *pfIB* que codifican para la piruvato formato liasa.

La atenuación de al menos uno de los genes *edd* y *eda*, que codifican para enzimas involucradas en la ruta de Entner-Doudoroff, también es útil para prevenir el metabolismo directo de glucosa a gliceraldehído-3-fosfato y piruvato que pueden evitar la ruta de síntesis de 1,2-propanodiol.

Ventajosamente, la disponibilidad de NADH para la reducción de los precursores en 1,2-propanodiol se incrementa bajo condiciones aeróbicas o microaeróbicas. Esto se obtiene reduciendo la represión del ciclo de los ácidos tricarbónicos mediada por el regulador global ArcA (codificado por el gen *arcA*). La concentración de NADH en la célula puede también incrementarse mediante la desactivación de la NADH deshidrogenasa II codificada por el gen *adh*. Por esa razón, preferentemente, al menos un gen seleccionado de entre *arcA* y *ndh* tiene su expresión atenuada.

Preferentemente, la cepa inicial se selecciona de un grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos.

Más preferentemente, la cepa inicial se selecciona de un grupo que consiste en Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Streptomycetaceae y Corynebacteriaceae.

En una forma de realización preferida de la invención, la cepa inicial es *Escherichia coli* o *Clostridium acetobutylicum*.

5 En esta cepa evolucionada, es ventajoso modificar la expresión de genes específicos por ejemplo incrementado o atenuando la expresión génica. Estas modificaciones permiten mejorar el resultado de la producción de 1,2-propanodiol.

Para obtener la sobreexpresión de un gen de interés, el experto en la materia conoce diferentes métodos, por ejemplo:

10

- sustitución del promotor endógeno por un promotor más fuerte.
- Introducción en el microorganismo de un vector de expresión portador de dicho gen de interés.

15

- Introducción de copias adicionales del gen de interés en el cromosoma.

El experto en la materia conoce varias técnicas para introducir ADN en cepas bacterianas. Una de las técnicas preferidas es la electroporación, que es ampliamente conocida por los expertos en la materia.

20 Para obtener la atenuación de la expresión de un gen, el experto en la materia conoce diferentes métodos que se describen a continuación.

25 En una forma de realización específica de la invención, la cepa evolucionada se modifica mediante una atenuación de la actividad gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), con el objetivo de reducir el flujo en la parte baja de la glicólisis y de redirigirla hacia la síntesis de DHAP y finalmente de 1,2-propanodiol (ver Figura 1). Esta actividad reducida puede obtenerse particularmente mediante la atenuación de la expresión del gen *gapA*.

30 El término "atenuación de la actividad de una enzima" hace referencia a la disminución de la actividad de la enzima de interés en comparación con la actividad observada en la cepa evolucionada antes de ninguna modificación. El experto en la materia conoce numerosas formas de obtener este resultado, por ejemplo:

- Introducción de una mutación en el gen, reduciendo el nivel de expresión de este gen, o el nivel de actividad de la proteína codificada.
- Sustitución del promotor natural del gen por un promotor débil, resultando una menor expresión.
- Utilización de elementos desestabilizadores del ARN mensajero correspondiente o de la proteína.
- Deleción del gen si no se desea ninguna expresión.

40

Ventajosamente, en la cepa evolucionada la eficiencia de la importación de azúcar se incrementa. Una fuerte atenuación de la expresión del gen *gapA*, resultante en una reducción del flujo de carbono hacia la reacción GAPDH de más del 50%, resultará en la síntesis de menos de 1 mol de fosfoenolpiruvato (PEP) por mol de glucosa importada. El sistema fosfotransferasa (PTS) que habitualmente asegura la importación de azúcares simples dentro de la célula esta acoplado a la reacción de fosforilación que produce glucosa-6-fosfato. El fosfato que se necesita para esta reacción proviene de la reacción de conversión de PEP en piruvato. De esta forma, reducir la cantidad de PEP producido mediante la reducción del flujo a través del gliceraldehído-3-fosfato reduce la importación de azúcar.

45

50 En una forma de realización específica de la invención, el azúcar puede ser importado dentro del microorganismo por un sistema de importación independiente de la disponibilidad de fosfoenolpiruvato. El simportador galactosa-protón codificado por el gen *galP* que no implica fosforilación puede ser utilizado. En este caso, la glucosa importada tiene que ser fosforilada por una glucosa quinasa codificada por el gen *glk*. Para promover esta ruta, se incrementa la expresión de al menos un gen seleccionado entre *galP* i *glk*. Como resultado de esto, el PTS se vuelve dispensable y puede ser eliminado mediante la atenuación de la expresión de al menos un gen seleccionado entre *ptsH*, *ptsI* o *crr*.

55

60 En otra forma de realización específica de la invención, la eficiencia del PTS se incrementa mediante el incremento de la disponibilidad del metabolito PEP. Debido a la atenuación de la actividad *gapA* y del menor flujo de carbono hacia piruvato, la cantidad de PEP en la cepa modificada podría ser limitada, provocando una menor cantidad de glucosa sea transportada dentro de la célula.

60

65 Existen diferentes medios que pueden utilizarse para incrementar la disponibilidad de PEP en una cepa de un microorganismo. En particular, una forma es el atenuar la reacción PEP → piruvato. Preferentemente, para obtener este resultado, se atenúa la expresión de al menos un gene seleccionado entre *pykA* y *pykF*, codificando para la enzima piruvato quinasa. Otro medio de incrementar la disponibilidad de PEP es el favorecer la reacción piruvato → PEP, catalizada por la fosfoenolpiruvato sintasa mediante el incremento de la actividad de esta enzima. Esta enzima

esta codificada por el gen *ppsA*. Por esta razón, preferentemente, se incrementa la expresión del gen *ppsA* en el microorganismo. Ambas modificaciones pueden estar presentes en el microorganismo de forma simultánea.

5 Especialmente bajo condiciones anaeróbicas o microaeróbicas, es ventajoso que el complejo piruvato deshidrogenasa (PDC), que convierte el piruvato en acetyl-coA, tenga baja sensibilidad a la inhibición por NADH. El término "baja sensibilidad" está definido en referencia a la sensibilidad de una enzima no modificada, como ya se demuestra en WO 2005/073364. En particular, tal característica puede obtenerse introduciendo una mutación específica en el gen *lpd* (que codifica para la subunidad lipoamida deshidrogenasa del PDC) resultando en la sustitución de la alanina 55 por una valina en la secuencia de la proteína.

10 En otra forma de realización específica de la invención, se previene la síntesis del subproducto acetato. Bajo condiciones completamente aeróbicas, el cofactor reducido NADH es preferentemente oxidado a NAD⁺ por la vía de la cadena respiratoria y con oxígeno como aceptor final de electrones. Por lo tanto, la síntesis de un subproducto (por ejemplo acetato) no es obligatoria. Es preferible evitar tal síntesis de acetato para optimizar la producción de 1,2-propanodiol.

15 Para prevenir la producción de acetato, ventajosamente se atenúa la actividad de al menos una enzima involucrada en la síntesis de acetato. Preferentemente, se atenúa la expresión de al menos un gen seleccionado entre *ackA*, *pta* y *poxB*, todos estos genes codificando para enzimas involucradas en diferentes rutas de biosíntesis del acetato (ver Figura 1).

20 Otro objeto de la invención es un método para preparar 1,2-propanodiol en el que una cepa evolucionada tal y como se describe anteriormente se hace crecer en un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente de carbono, y después el 1,2-propanodiol producido se recupera. La producción de 1,2-propanodiol se realiza bajo condiciones aeróbicas, microaeróbicas o anaeróbicas.

25 Las condiciones de cultivo (fermentación) para los microorganismos pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la materia. En particular, las bacterias se fermentan a temperaturas de entre 20°C y 55°C, preferentemente entre 25°C y 40°C, y preferentemente a aproximadamente 35°C para *C. acetobutylicum* y a aproximadamente 37°C para *E. coli*.

Este proceso puede llevarse a cabo ya sea en un proceso en lotes, en un proceso en lotes alimentados o en un proceso continuo.

35 La cepa evolucionada puede utilizarse para producir 1,2-propanodiol bajo condiciones aeróbicas, microaeróbicas, o anaeróbicas.

40 "Bajo condiciones aeróbicas" significa que se provee oxígeno al cultivo disolviendo el gas en la fase líquida. Esto puede obtenerse mediante (1) la inyección de un gas que contenga oxígeno (por ejemplo aire) en la fase líquida o (2) la agitación del recipiente que contiene el medio de cultivo con el objetivo de transferir a la fase líquida el oxígeno contenido en el espacio libre superior. Una ventaja de la fermentación bajo condiciones aeróbicas en lugar de bajo condiciones anaeróbicas es que la presencia de oxígeno como aceptor de electrones mejora la capacidad de la cepa de producir más energía para procesos celulares en forma de ATP. Por lo tanto la cepa tiene su metabolismo general mejorado.

45 Las condiciones microaeróbicas se definen como las condiciones de cultivo en las que porcentajes de oxígeno bajos se disuelven en la fase líquida (por ejemplo utilizando una mezcla de gases que contenga entre 0,1 y 10% de oxígeno, completada hasta el 100% con nitrógeno).

50 Las condiciones anaeróbicas se definen como las condiciones de cultivo en las que no se provee oxígeno al medio de cultivo. Las condiciones estrictamente anaeróbicas se obtienen mediante la inyección de un gas inerte como el nitrógeno en el medio de cultivo para eliminar trazas de otros gases. El nitrato puede entonces ser utilizado como un aceptor de electrones mejorando la producción de ATP por la cepa y mejorando su metabolismo.

55 El cultivo de cepas, durante el proceso de evolución y el proceso de fermentación para la producción de 1,2-propanodiol, se lleva a cabo en fermentadores con medio de cultivo de composición establecida y conocida adaptada a las bacterias que se usan y conteniendo al menos una fuente de carbono. En particular, un medio de crecimiento mineral para *E. coli* puede así ser idéntico o de composición similar al medio M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), al 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, New York) o a un medio como el definido por Schaefer *et al.* (1999, *Anal Biochem.* 270:88-96), en particular el medio de cultivo mínimo denominado MPG que se describe a continuación:

65

ES 2 525 796 T3

K ₂ HPO ₄	1,4 g/l
Ácido nitrilotriacético	0,2 g/l
Solución de elementos traza*	10 ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/l
NaCl	0,2 g/l
NaHCO ₃	0,2 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
Glucosa	20 a 100 g/l
NaNO ₃	0,424 g/l
Tiamina	10 mg/l
FeSO ₄ , 7H ₂ O	50 mg/l
Extracto de levadura	4 g/l

El pH del medio se ajusta a 7,4 con hidróxido de sodio.

5 *solución de elementos traza : Ácido cítrico 4,37 g/l, MnSO₄ 3 g/l, CaCl₂ 1 g/l, CoCl₂, 2H₂O 0,1 g/l, ZnSO₄, 7H₂O 0,10 g/l, CuSO₄, 5H₂O 10 mg/l, H₃BO₃ 10 mg/l, Na₂MoO₄ 8,31 mg/l.

10 En una forma de realización específica, el método se realiza con una cepa evolucionada de *E. coli* en un medio de crecimiento que contiene una fuente de carbono simple que puede ser: arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, sucrosa o xilosa. Una fuente de carbono simple preferida especialmente es glucosa.

En otra forma de realización específica, el método se realiza con una cepa evolucionada de *Clostridium acetobutylicum*, en un medio de crecimiento que contiene una fuente de carbono simple o compleja.

15 El medio de crecimiento para *C. acetobutylicum* puede así ser idéntico o de composición similar al Medio de Crecimiento Clostridial (del inglés Clostridial Growth Medium, CGM, Wiesenborn et al. Appl. Environm. Microbiol., 54:2717-2722) o al medio de crecimiento mineral como el dado por Monot et al. (Appl. Environm. Microbiol., 44:1318-1324) o Vasconcelos et al. (J. Bacterial., 176:1443-1450).

20 La fuente de carbono utilizada para el cultivo de *C. acetobutylicum* es una fuente de carbono simple o compleja. La fuente de carbono simple puede ser arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, sucrosa o xilosa. Una fuente de carbono simple preferida especialmente es glucosa. La fuente de carbono compleja puede ser almidón o hemicelulosa. Una fuente de carbono compleja preferida especialmente es almidón.

25 Preferentemente, el 1,2-propanodiol recuperado además se purifica. El experto en la materia conoce métodos para recuperar y purificar el 1,2-propanodiol producido. Estos métodos son procesos habituales.

30 La invención se describe anteriormente, posteriormente, y en los Ejemplos con respecto a *E. coli*. Así los genes que pueden ser atenuados, eliminados o sobreexpresados para las cepas inicial y evolucionadas de acuerdo con la divulgación están definidas principalmente utilizando la denominación de los genes de *E. coli*. Sin embargo, esta designación tiene un significado más general de acuerdo con la divulgación y abarca los genes correspondientes en otros microorganismos. Utilizando las referencias GenBank de los genes de *E. coli*, los expertos en la materia pueden determinar genes equivalentes en organismos otros que *E. coli*.

35 Los medios de identificación de las secuencias homólogas y de su porcentaje de homología son bien conocidos por los expertos en la materia, e incluyen, en particular, los programas BLAST que pueden utilizarse en el sitio Web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros por defecto indicados en dicho sitio Web. Las secuencias obtenidas pueden ser explotadas (alineadas) utilizando por ejemplo programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) con los parámetros por defecto indicados en dichos sitios Web.

40 La base de datos PFAM (Alineamientos y modelos ocultos de Markov de familias de proteínas, <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) es una amplia colección de alineamientos de secuencias de proteínas. Cada PFAM hace posible visualizar múltiples alineamientos, ver dominios proteicos, evaluar distribuciones entre organismos, ganar acceso a otras bases de datos y visualizar estructuras de proteínas conocidas.

45 Los COGs (Clústeres de grupos ortólogos de proteínas <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen comparando secuencias de proteínas derivadas de 66 genomas completamente secuenciados que representan 44 líneas

filogenéticas importantes. Cada COG está definido a partir de al menos 3 líneas, haciendo posible la identificación de dominios conservados.

Referencias en el orden en el que aparecen citados en el texto

- 5 1. Badia J, Ros J, Aguilar J (1985), *J. Bacteriol.* 161: 435-437.
2. Tran Din K and Gottschalk G (1985), *Arch. Microbiol.* 142: 87-92
3. Cameron DC and Cooney CL (1986), *Bio/Technology*, 4: 651-654
4. Sanchez-Rivera F, Cameron DC, Cooney CL (1987), *Biotechnol. Lett.* 9: 449-454
5. Altaras NE and Cameron DC (1999), *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 1180-1185
- 10 6. Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw AJ (1998), *Biotechnol. Prog.* 14 : 116-125
7. Altaras NE and Cameron DC (2000), *Biotechnol. Prog.* 16: 940-946
8. Huang K, Rudolph FB, Bennett GN (1999), *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 3244-3247
9. Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN (2003), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 34-40
10. Datsenko KA and Wanner BL (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640-6645
- 15 11. Anderson EH (1946), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128
12. 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, New York
13. Schaefer U, Boos W, Takors R, Weuster-Botz D (1999), *Anal. Biochem.* 270: 88-96
14. Wiesenbom DP, Rudolph RB, Papoutsakis ET (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 : 2717-2722
- 20 15. Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R (1982), *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1318-1324
16. Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P (1994), *J. Bacteriol.* 176: 1443-1450

Ejemplos

Los siguientes ejemplos muestran:

- 25 1- Construcción de una cepa modificada de *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$, Δndh
- 2- Evolución dicha cepa inicial
- 3- Reconstrucción del gen *tpiA* en la cepa evolucionada seleccionada
- 30 4- Atenuación del gen *gapA*; Deleción de los genes *pykA* y *pykF*; Sobreexpresión de el gen *ppsA*
- 5- Deleción de los genes *ackA-pta*, *poxB*
- 6- Comparación de varias cepas obtenidas en cuanto a la producción de 1,2-propanodiol bajo condiciones aeróbicas
- 7- Producción de 1,2-propanodiol en cultivo en lote alimentado con la mejor cepa.

Ejemplo 1: construcción de una cepa modificada de *E.coli* MG1655 *lpd, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$, Δndh capaz de evolucionar hacia una producción mejorada de 1,2-propanodiol:**

- 40 a) Construcción de una cepa modificada *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, *ldhA::Km*, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd

El cassette de resistencia a cloramfenicol se eliminó de la cepa *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, *ldhA::km*, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd::cm$ (Ver WO2005073364) de acuerdo con el Protocolo 1.

Protocolo 1: Eliminación de cassettes de resistencia

5 Los cassettes de resistencia a cloramfenicol y/o a kanamicina se eliminaron de acuerdo con la siguiente técnica. El plásmido pCP20 portador de la FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT de los cassettes de resistencia a cloramfenicol y/o a kanamicina se introdujo en la cepa mediante electroporación. Después de un cultivo seriado a 41°C, la pérdida de los cassettes de resistencia a antibiótico se verificó mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 1.

10 La presencia de modificaciones previamente construidas en la cepa se verificó utilizando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 1.

15 La cepa obtenida se nombró *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, *ldhA::km*, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd .

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para la verificación de la inserción de un cassette de resistencia o la pérdida de un cassette de resistencia

Nombre de la región	Nombre de los oligos	SEQ ID	Homología con la región cromosómica
<i>gen tpiA</i>	cdh	Nº1	Ver WO2005073364
(delección)	YIIQ	Nº2	
<i>gen pflAB</i>	pflABF	Nº3	Ver WO2005073364
	pflABR	Nº4	
<i>gen adhE</i>	yChGf	Nº5	Ver WO2005073364
	adhECr	Nº6	
<i>gen ldhA</i>	hslJC	Nº7	Ver WO2005073364
(inserción cassette)	ldhAC2	Nº8	
<i>gen gloA</i>	NemACd	Nº9	Ver WO2005073364
	Rnt Cr	Nº10	
<i>gen aldA</i>	Ydc F C f	Nº11	Ver WO2005073364
	gapCCr	Nº12	
<i>gen aldB</i>	aldB C f	Nº13	Ver WO2005073364
	YiaYCr	Nº14	
<i>gen edd</i>	Edad	Nº15	Ver WO2005073364
	Zwf r	Nº16	
<i>gen ldhA gene</i>	ldhAF	Nº17	1439724 hasta 1439743
(delección)	ldhAR	Nº18	1441029 hasta 1441007
<i>gen arcA</i>	arcAF	Nº19	4638292 hasta 4638273
	arcAR	Nº20	4636854 hasta 4636874
<i>gen ndh</i>	ndhF	Nº21	1164722 hasta 1164742
	ndhR	Nº22	1167197 hasta 1167177
<i>gen tpiA</i>	YIIQ	Nº2	4109599 hasta 4109580
(reconstrucción)	tpiA R	Nº23	4108953 hasta 4108973
<i>promotor gapA</i>	yeaAF	Nº24	1860259-1860287
(Ptrc16-gapA)	gapAR	Nº25	1861068-1861040
<i>gen pykA</i>	pykAF	Nº26	1935338 hasta 1935360
	pykAR	Nº27	1937425 hasta 1937401
<i>gen pykF</i>	pykFF	Nº28	1753371 hasta 1753392

Nombre de la región	Nombre de los oligos	SEQ ID	Homología con la región cromosómica
	pykFR	N°29	1755518 hasta 1755495
<i>genes ackA-pta</i>	B2295	N°30	2410900 hasta 2410919
	YfcCR	N°31	2415164 hasta 2415145
<i>genes poxB</i>	poxBF	N°32	908475 hasta 908495
	poxBR	N°33	910375 hasta 910352

b) Construcción de una cepa modificada *E. coli* MG1655 *lpd, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA::cm$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd**

5 Para eliminar el cassette de resistencia a kanamicina y para desactivar el gen *ldhA*, el cassette de resistencia a cloramfenicol se insertó en el gen *ldhA* delecionando la mayor parte del gen en cuestión de acuerdo con el Protocolo 2.

Protocolo 2: Introducción de un producto de PCR para recombinación y selección de los recombinantes

10 Los oligonucleótidos elegidos para la sustitución de un gen o de una región intergénica y detallados en la Tabla 2 se utilizaron para amplificar ya sea el cassette de resistencia a cloramfenicol a partir del plásmido pKD3 o el cassette de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000)). El producto de PCR obtenido se introdujo posteriormente mediante electroporación en la cepa receptora portadora del plásmido pKD46 en el que el sistema λ Red (γ , β , exo) expresado favorece enormemente la recombinación homóloga. Los transformantes resistentes a antibiótico fueron entonces seleccionados y la inserción del cassette de resistencia fue verificada por análisis PCR utilizando los oligonucleótidos apropiados que se detallan en la Tabla 1.

Las demás modificaciones de la cepa fueron verificadas con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 1.

La cepa resultante se nombró *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta ldhA::cm$, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd .

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para la sustitución de una región cromosómica por recombinación con un producto de PCR en la cepa *E. coli* MG1655

Nombre de la región	Nombre de los oligos	SEQ ID	Homología con la región cromosómica
<i>gen ldhA</i>	DldhAF	N°34	1440865- 1440786
	DldhAR	N°35	1439878- 1439958
<i>gen arcA</i>	DarcAF	N°36	4637868-4637791
	DarcAR	N°37	4637167-4637245
<i>gen ndh</i>	DndhF	N°38	1165071-1165149
	DndhR	N°39	1166607-1166528
<i>gen tpiA</i>	tpiA::kmF	N°40	4109264 - 4109195
(reconstrucción)	tpiA::kmR	N°41	4109109 - 4109193
<i>promotor gapA</i>	P _{trc} -gapAF	N°42	1860478-1860536
(P _{trc} 16-gapA)	P _{trc} -gapAR	N°43	1860762-1860800
<i>gen pykA</i>	DpykAF	N°44	1935756-1935836
	DpykAR	N°45	1937055-1937135
<i>gen pykF</i>	DpykFF	N°46	1753689-1753766
	DpykFR	N°47	1755129-1755051
<i>genes ackA-pta</i>	DackAF	N°48	2411494-2411573
	DptaR	N°49	2414906-2414830
<i>genes poxB</i>	DpoxBF	N°50	908557-908635
	DpoxBR	N°51	910262-910180

c) Construcción de una cepa modificada *E. coli* MG1655 $\Delta arcA::km$

El gen *arcA* fue desactivado en la cepa *E. coli* MG1655 mediante la inserción de un cassette de resistencia a kanamicina y la delección de la mayoría del gen en cuestión utilizando la técnica descrita en el Protocolo 2 con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 2. La cepa resultante se nombró *E. coli* MG1655 $\Delta arcA::km$.

d) Construcción de una cepa modificada de *E. coli* MG1655 lpd^* , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$

La delección del gen *arcA* mediante la sustitución de este gen por un cassette de resistencia a kanamicina en la cepa *E. coli* MG1655 lpd^* , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA::cm$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd se llevó a cabo mediante la técnica de transducción con el fago P1.

Protocolo 3: Transducción con fago P1 para la delección de un gen

La delección del gen elegido mediante la sustitución de este gen por un cassette de resistencia (kanamicina o cloramfenicol) en la cepa de *E. coli* receptora se realizó utilizando la técnica de transducción con fago P1. El protocolo consistió de dos etapas, (i) la preparación del lisado fágico en la cepa MG1655 con un único gen delecionado y (ii) a transducción de la cepa receptora por este lisado fágico.

Preparación del lisado fágico

- Sembrar 10 mL de LB + Cm 30 µg/ml + glucosa 0,2% + CaCl₂ 5 mM con 100 µL de un cultivo durante toda la noche de la cepa MG1655 con un único gen delecionado.
- Incubar durante 30 min a 37°C con agitación.
- Añadir 100 µL de lisado de fago P1 preparado en la cepa MG1655 salvaje (aprox. 1×10^9 fagos/ml).
- Agitar a 37°C durante 3 horas hasta que todas las células se hayan lisado.
- Añadir 200 µL de cloroformo y agitar con el vortex.
- Centrifugar durante 10 min a 4500 g para eliminar los restos celulares.
- Transferir el sobrenadante a un tubo estéril y añadir 200 µL de cloroformo.
- Almacenar el lisado a 4°C.

Transducción

- Centrifugar 5 mL de un cultivo "overnight" de una cepa de *E. coli* receptora en medio LB durante 10 min a 1500 g.
- Suspender el pélet de células en 2,5 mL de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM.
- Tubos control: 100 µL células
100 µL fagos P1 de la cepa MG1655 con un único gen delecionado.
- Tubo prueba: 100 µL de células + 100 µL de fagos P1 de la cepa MG1655 con un único gen delecionado.
- Incubar durante 30 min a 30°C sin agitación.
- Añadir 100 µL de citrato de sodio 1 M en cada tubo y agitar con el vortex.
- Añadir 1 mL de LB.
- Incubar durante 1 hora a 37°C con agitación.
- Sembrar en placas de LB + Cm 30 µg/ml después de haber centrifugado los tubos durante 3 min a 7000 rpm.
- Incubar a 37°C durante toda la noche.

Los transformantes resistentes a antibiótico fueron seleccionados posteriormente y la inserción de la delección se verificó mediante un análisis PCR utilizando los oligonucleótidos apropiados detallados en la Tabla 1.

La cepa resultante se nombró *E. coli* MG1655 lpd^* , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA::cm$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA::km$.

Los cassettes de resistencia a cloramfenicol y kanamicina se eliminaron posteriormente de acuerdo con el Protocolo 1. La cepa obtenida se nombró *E. coli* MG1655 lpd^* , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$.

e) Construcción de una cepa modificada de *E. coli* MG1655 $\Delta ndh :: km$

El gen *ndh* fue desactivado mediante la inserción de un cassette de resistencia a antibiótico kanamicina y la delección de la mayor parte del gen en cuestión utilizando la técnica descrita en el Protocolo 2 con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 2. La cepa resultante se nombró *E. coli* MG1655 $\Delta ndh::km$.

f) Construcción de una cepa *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$, Δndh

La delección del gen *ndh* por sustitución del gen por un cassette de resistencia a kanamicina en la cepa *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta adhE$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$ se realizó igual que previamente utilizando la técnica de transducción con fago P1 descrita en el Protocolo 3.

La cepa resultante se nombró *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$, $\Delta ndh::km$.

Posteriormente se eliminó el cassette de resistencia a kanamicina de acuerdo con el Protocolo 1. La cepa obtenida de nombró *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$, Δndh .

En cada etapa, la presencia de las modificaciones previamente construidas en la cepa se verificó utilizando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 1.

Ejemplo 2: Evolución de la cepa modificada *E. coli* MG1655 *lpd $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA::cm$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd en un cultivo en quimiostato bajo condiciones microaeróbicas y caracterización fisiológica de la evolución:**

Con tal de evolucionarla hacia una producción mejorada de 1,2-propanodiol, la cepa *E. coli* MG1655 *lpd** $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA::cm$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd se cultivó en un cultivo continuo bajo condiciones anaeróbicas por un lado y bajo condiciones microaeróbicas (1% oxígeno) por otro en medio de cultivo MPG tal y como se ha descrito anteriormente, con exceso de glucosa (desde 20 g/l inicialmente y adición si la glucosa se consume totalmente). La temperatura se fijó a 37°C y el pH se reguló a 6,5 mediante la adición de base. La evolución de la cepa en los quimiostatos vino seguida por un aumento de la biomasa acoplado a un aumento de las concentraciones del producto, 1,2-propanodiol y del co-producto acetato, a lo largo de varias semanas (desde 4 semanas hasta 6 meses). Esto significó la mejora del comportamiento de las cepas. Cuando el cultivo alcanzó un estado estacionario sin ningún otro incremento de las concentraciones bajo estas condiciones, la evolución se dio por concluida.

Las características de las cepas antes y después de la evolución fueron evaluadas. Se aislaron colonias individuales representando clones individuales en placas de Petri. Estos clones fueron evaluados utilizando la cepa inicial como control en un ensayo en frasco Erlenmeyer, utilizando el mismo medio MPG utilizado en el cultivo en quimiostato. De entre estos clones, varios presentaron una mejor tasa de producción específica de 1,2-propanodiol al compararlos con el control. Estos clones fueron seleccionados para las etapas siguientes. Los resultados obtenidos en el mejor clon para cada condición de evolución están detallados en la Tablas 4 y 5 a continuación.

Tabla 4: Comparación del mejor clon evolucionado obtenido después de una evolución bajo condiciones anaeróbicas con la cepa inicial.

Cepa <i>E. coli</i> MG1655 <i>lpd*</i> $\Delta tpiA$ $\Delta pflAB$ $\Delta adhE$ $\Delta ldhA::cm$ $\Delta gloA$ Δald , $\Delta aldB$ Δedd	Cepa inicial antes de evolución (resultados medidos después de 2 días de cultivo)	Mejor clon evolucionado (resultados medidos después de 2 días de cultivo)
Tasa de consumo específica de glucosa (g glucosa /g biomasa /h)	0,12	0,21 (+ 75%)
Tasa de producción específica de 1,2-propanodiol (g 1,2-propanodiol /g biomasa /h)	0,02	0,07 (+250%)
Tasa de producción específica de 1,2-propanodiol + hidroxiacetona (g 1,2-propanodiol + hidroxiacetona /g biomasa /h)	0,04	0,08 (+100%)

Tabla 5: Comparación del mejor clon evolucionado obtenido después de una evolución bajo condiciones microanaeróbicas con la cepa inicial.

Cepa <i>E. coli</i> MG1655 <i>lpd*</i> $\Delta tpiA$ $\Delta pflAB$ $\Delta adhE$ $\Delta ldhA::cm$ $\Delta gloA$ Δald , $\Delta aldB$ Δedd	Cepa inicial antes de evolución (resultados medidos después de 2 días de cultivo)	Mejor clon evolucionado (resultado medidos después de 2 días de cultivo)
Tasa de consumo específica de glucosa (g glucosa /g biomasa /h)	0,10	0,22 (+ 120%)
Tasa de producción específica de 1,2-	0,01	0,08 (+700%)

Cepa <i>E. coli</i> MG1655 <i>lpd*</i> Δ <i>tpiA</i> Δ <i>plfAB</i> Δ <i>adhE</i> Δ <i>ldhA::cm</i> Δ <i>gloA</i> Δ <i>ald</i> , Δ <i>aldB</i> Δ <i>edd</i>	Cepa inicial antes de evolución (resultados medidos después de 2 días de cultivo)	Mejor clon evolucionado (resultado medidos después de 2 días de cultivo)
propanodiol (g 1,2-propanodiol /g biomasa /h)		
Tasa de producción específica de 1,2-propanodiol + hidroxiacetona (g 1,2-propanodiol + hidroxiacetona /g biomasa /h)	0,04	0,08 (+ 100%)

Como estos clones han sido cultivados durante un periodo de tiempo extendido en medio de cultivo con extracto de levadura, necesitaron ser adaptados a un crecimiento en medio mínimo. Los dos mejores clones, cuyos resultados se detallan en la Tabla 4 y 5 fueron adaptados mediante cultivo seriado en medio mínimo para aumentar sus tasas de crecimiento bajo tales condiciones y la adaptación se paró cuando sus tasas de crecimiento fueron estables. Clones del cultivo final fueron aislados y se verificó que fueran representativos de la población adaptada.

Ejemplo 3: reconstrucción del gen *tpiA* en la cepa evolucionada y seleccionada de *E. coli* MG1655 *lpd, Δ *tpiA*, Δ *plfAB*, Δ *adhE*, Δ *ldhA::cm*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB*, Δ *edd* :**

a) Construcción de una cepa modificada *E. coli* MG1655 *tpiA::km*

Un cassette de resistencia a antibiótico kanamicina se insertó por delante del gen *tpiA* de acuerdo con la técnica descrita en el Protocolo 2 con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 2. La cepa resultante se nombró *E. coli* MG1655 *tpiA::km*.

Posteriormente la reconstrucción del gen *tpiA* en la cepa evolucionada *E. coli* MG1655 *lpd**, Δ *tpiA*, Δ *plfAB*, Δ *adhE*, Δ *ldhA::cm*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB*, Δ *edd*, Δ *arcA*, Δ *ndh* se realizó utilizando la técnica de transducción con fago P1 descrita en el Protocolo 3.

La cepa resultante se nombró *E. coli* MG1655 *lpd**, *tpiArc::km*, Δ *plfAB*, Δ *adhE*, Δ *ldhA::cm*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *adhB*, Δ *edd*, Δ *arcA*, Δ *ndh* evolucionada.

Los cassettes de resistencia a kanamicina y a cloramfenicol se eliminaron posteriormente de acuerdo con el Protocolo 2. La cepa obtenida se nombró "*E. coli tpiArc evolucionada*".

La presencia de las modificaciones previamente construidas en la cepa se verificó utilizando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 1.

Ejemplo 4: Modificaciones de la "*E. coli tpiArc evolucionada*": atenuación del gen *gapA*; delección de los genes *pykA* y *pykF*; sobreexpresión del gen *ppsA* con un vector *pJB137-PgapA-ppsA*

a) Sustitución del promotor natural *gapA* por un promotor corto sintético *Ptrc16*:

La sustitución del promotor natural *gapA* por un promotor corto sintético *Ptrc16* (SEQ ID NO 52: gagctgttgacggattaatcatccggctcgaataatgtgtggaa) en la cepa "*E. coli tpiArc evolucionada*" se realizó mediante la sustitución de 225 pb de secuencia por delante de la secuencia *gapA* por FRT-CmR-FRT y un promotor diseñado.

La técnica utilizada está descrita en el Protocolo 2 con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 2. La cepa resultante se nombró "*E. coli tpiArc evolucionada*" *Ptrc16-gapA::cm*.

El cassette de resistencia a cloramfenicol se eliminó posteriormente de acuerdo con el Protocolo 1. La cepa obtenida se nombró "*E. coli tpiArc evolucionada*" *Ptrc16-gapA*.

b) Delección del gen *pykA*

EL gen *pykA* se desactiva mediante la inserción de un cassette de resistencia a antibiótico kanamicina y la delección de la mayor parte del gen en cuestión utilizando la técnica descrita en el Protocolo 2 con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 2. La cepa resultante se nombra "*E. coli tpiArc evolucionada*" *Ptrc16-gapA* Δ *pykA::km*.

El cassette de resistencia a kanamicina se elimina posteriormente de acuerdo con el Protocolo 1. La cepa obtenida se nombra "*E. coli tpiArc evolucionada*" *Ptrc16-gapA* Δ *pykA*.

c) Delección del gen *pykF*

El gen *pykF* se desactiva mediante la inserción de un cassette de resistencia a antibiótico kanamicina y la delección de la mayor parte del gen en cuestión utilizando la técnica descrita en el Protocolo 2 con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 2. La cepa resultante se nombra “*E. coli tpiArc* evolucionada” *Ptrc16-gapA, ΔpykA, ΔpykF::km*.

- 5 Al igual que previamente, el cassette de resistencia a kanamicina se elimina posteriormente de acuerdo con Protocolo 1. La cepa obtenida se nombra “*E. coli tpiArc* evolucionada” *Ptrc16-gapA, ΔpykA, ΔpykF*.

d) Introducción de un vector de expresión *pJB137-PgapA-ppsA* en la cepa

- 10 Para incrementar la producción de fosfoenolpiruvato el gen *ppsA* se expresó a partir del plásmido pJB137 utilizando el promotor *gapA*. Para la construcción del plásmido pJB137-PgapA-ppsA, el gen *ppsA* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *E. coli* MG1655 utilizando lo siguientes oligonucleótidos:

1. *gapA-ppsAF*, formado por 65 bases (SEQ ID NO 53)

15 cctttattcactaacaataagctggggaatatATGTCCAACAATGGCTCGTCACCGCTGGTGC

con:

- 20 - una región (letras mayúsculas) homóloga a la secuencia (1785106-1785136) del gen *ppsA* (1785136 hasta 1782758), una secuencia de referencia en el sitio Web <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>, y
- una región (letras minúsculas) homóloga al promotor *gapA* (1860794 - 1860761).

2. *ppsAR*, formado por 43 bases (SEQ ID NO 54)

25 aatcgcaagcttGAATCCGGTTATTTCTTCAGTTCAGCCAGGC

con:

- 30 - una región (letras mayúsculas) homóloga a la secuencia (1782758-1782780) la región del gen *ppsA* (1785136 hasta 1782758)
- un sitio de restricción *HindIII* (letras subrayadas)

- 35 Al mismo tiempo se amplificó la región promotora *gapA* del gen *gapA* de *E. coli* utilizando los siguientes oligonucleótidos:

1. *gapA-ppsAR*, formado por 65 bases (SEQ ID NO 55)

40 GCACCAGCGGTGACGAGCCATTGTTGGACATatattccaccagctattgttagtgaataaaagg

con:

- 45 - una región (letras mayúsculas) homóloga a la secuencia (1785106 - 1785136) del gen *ppsA* (1785136 hasta 1782758), y
- una región (letras minúsculas) homóloga al promotor *gapA* (1860794 - 1860761).

2. *gapAF*, formado por 33 bases (SEQ ID NO 56)

50 ACGTCCCGGGcaagcccaaaggaagagtgaggc

con:

- 55 - una región (letras mayúsculas) homóloga al promotor *gapA* (1860639 - 1860661).
- un sitio de restricción *SmaI* (letras subrayadas)

- 60 Ambos fragmentos fueron subsecuentemente fusionados utilizando los oligonucleótidos *ppsAR* y *gapAF* (Horton et al. 1989 Gene 77:61-68). Los fragmentos amplificados por PCR fueron cortado con las enzimas de restricción *HindIII* y *SmaI* y clonado en los sitios *HindIII/SmaI* del vector pJB137 (Número de acceso EMBL: U75326) dando como resultado el vector pJB137-PgapA-ppsA. Los plásmidos recombinantes fueron verificados mediante secuenciación de ADN.

- 65 El plásmido pJB137-PgapA-ppsA se introduce en la cepa “*E. coli tpiArc* evolucionada” *Ptrc16-gapA, ΔpykA, ΔpykF*.

La cepa obtenida se nombra “*E. coli tpiArc* evolucionada” *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, (ρ *JB137-PgapA-ppsA*).

En cada etapa, la presencia de modificaciones previamente construidas en la cepa se verificó utilizando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 1.

5 **Ejemplo 5: construcción de una cepa “*E. coli tpiArc* evolucionada” *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB* (ρ *JB137-PgapA-ppsA*) capaz de producir 1,2-propanodiol sin acetato como subproducto.**

10 a) Construcción de una cepa modificada *E. coli* MG1655 Δ *ackA-pta::cm*

Los genes *ackA* y *pta* se desactivan mediante la inserción de un cassette de resistencia a antibiótico cloramfenicol y la delección de la mayor parte del gen en cuestión utilizando la técnica descrita en el Protocolo 2 con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 2. La cepa resultante se nombra *E. coli* MG1655 Δ *ackA-pta::cm*.

15 b) Construcción de una cepa “*E. coli tpiArc* evolucionada” *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, Δ *ackA-pta*

La delección de los genes *ackA* y *pta* en la cepa “*E. coli tpiArc* evolucionada” *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF* se realiza tal y como se ha descrito previamente utilizando la técnica de transducción con fago P1 descrita en el Protocolo 3.

20 La cepa resultante se nombra “*E. coli tpiArc* evolucionada” *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, Δ *ackA-pta::cm*.

Tal y como se ha descrito previamente, el cassette de resistencia a cloramfenicol se elimina posteriormente de acuerdo con el Protocolo 1. La cepa obtenida se nombra “*E. coli tpiArc* evolucionada” *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, Δ *ackA-pta*.

25 c) Construcción de una cepa modificada “*E. coli tpiArc* evolucionada” *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB* (ρ *JB137-PgapA-ppsA*)

30 El gen *poxB* se desactiva mediante la inserción de un cassette de resistencia a antibiótico cloramfenicol y la delección de la mayor parte del gen en cuestión utilizando la técnica descrita en el Protocolo 2 con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 2.

La cepa resultante se nombra *E. coli tpiArc* evolucionada *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB::cm*.

35 Tal y como se ha descrito previamente, el cassette de resistencia a cloramfenicol se elimina posteriormente de acuerdo con el Protocolo 1. La cepa obtenida se nombra *E. coli tpiArc* evolucionada *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*.

40 El plásmido ρ *JB137-PgapA-ppsA* se introduce en la cepa *E. coli tpiArc* evolucionada *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*. La cepa obtenida se nombra *E. coli tpiArc* evolucionada *Ptrc16-gapA*, Δ *pykA*, Δ *pykF*, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB* (ρ *JB137-PgapA-ppsA*).

En cada etapa, la presencia de modificaciones previamente construidas en la cepa se verificó utilizando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 1.

45 **Ejemplo 6: Comparación de las diferentes cepas evolucionadas para la producción de 1,2-propanodiol bajo condiciones aeróbicas**

50 Las cepas obtenidas tal y como se describe en el Ejemplo 4 y las cepas control (control 1: MG1655 Δ *tpiA* Δ *pflAB* Δ *adhE* Δ *dhaA::Cm* Δ *gloA* Δ *ald*, Δ *aldB* Δ *edd* evolucionada bajo condiciones anaeróbicas y control 2: MG1655 Δ *tpiA* Δ *pflAB* Δ *adhE* Δ *dhaA::Cm* Δ *gloA* Δ *ald*, Δ *aldB* Δ *edd* evolucionada bajo condiciones microaeróbicas) fueron cultivadas en un ensayo en frasco Erlenmeyer bajo condiciones aeróbicas en medio mínimo suplementado con extracto de levadura y con glucosa como fuente de carbono. El cultivo se llevó a cabo a 34°C y el pH se mantuvo tamponando el medio de cultivo con MOPS. Al final del cultivo, el 1,2-propanodiol, el acetol y la glucosa residual en el caldo de fermentación fueron analizados mediante HPLC y se calcularon los rendimientos de 1,2-propanodiol por glucosa y 1,2-propanodiol + acetol por glucosa. La mejor cepa se selecciona posteriormente para un cultivo en lote alimentado en fermentador.

Cepa	Título 1,2-propanodiol (g/l)	Título Acetol (g/l)	Rendimiento 1,2-propanodiol (g/g glucosa)	Rendimiento 1,2-propanodiol + acetol (g/g glucosa)
Control 1	1,88	2,1	0,16	0,34
Control 2	0,7	3,56	0,06	0,37
“ <i>E.coli tpiArc</i> evolucionada”, <i>Ptrc16-gapA</i> ,	0,5	2,77	0,06	0,42

Cepa	Título 1,2-propanodiol (g/l)	Título Acetol (g/l)	Rendimiento 1,2-propanodiol (g/g glucosa)	Rendimiento 1,2-propanodiol + acetol (g/g glucosa)
(<i>pJB 137-PgapA-ppsA</i>) (construida a partir de control 1)				
" <i>E. coli tpiArc evolucionada</i> ", <i>Ptrc16-gapA</i> , (<i>pJB137-PgapA-ppsA</i>) (construida a partir de control 2)	3,71	3,85	0,20	0,41

Ejemplo 7: Producción de 1,2-propanodiol en cultivo en lote alimentado con la mejor cepa

5 La mejor cepa seleccionada en el experimento previo se cultiva en un fermentador de 2L utilizando un protocolo de cultivo en lote alimentado.

10 La temperatura del cultivo se mantiene constante a 37°C y el pH está permanentemente ajustado a valores de entre 6,5 y 8 utilizando una solución de NH₄OH. La frecuencia de agitación se mantiene entre 200 y 300 rpm durante la fase en lote y se incrementa hasta 1000 rpm al final de la fase en lote alimentado. La concentración de oxígeno disuelto se mantiene en valores de entre 30 y 40% de saturación utilizando un controlador de gases. Cuando la densidad óptica alcanza valores de entre tres y cinco, se empieza el lote alimentado con un flujo inicial de entre 0,3 y 0,5 mL/h, y un incremento progresivo hasta valores de flujo de entre 2,5 y 3,5 mL/h. En este punto el flujo se mantiene constante durante 24 a 48 horas. El medio de la alimentación está basado en medio mínimo conteniendo glucosa a concentraciones de entre 300 y 500 g/l.

15 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> EXPLORADOR METABÓLICO

<120> Nuevo microorganismo para la producción de 1,2-propanodiol obtenido mediante la combinación de evolución y diseño racional

<130> D24916

20 <150> PCT/IB2007/001680
< 151> 2007-03-23

<160> 56

<170> PatentIn version 3.3

25 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

30 <400> 1
ggtgatgata gttatcgccg

20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
35 <213> artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 2
cgtgccatcg acagcagtc

20

	<210> 3 <211> 30 <212> ADN <213> artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 3 agacattaa aatatacgtg cagctaccg	30
10	<210> 4 <211> 30 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
15	<400> 4 gtgaaagctg acaaccctt tgatcttta	30
20	<210> 5 <211> 22 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 5 ggctcattgc accaccatcc ag	22
25	<210> 6 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 6 gaaaagacgc gctgacaata cgcc	24
35	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
40	<400> 7 gccatcagca ggcttagccg	20
	<210> 8 <211> 23 <212> ADN <213> artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 8 gggtattgtg gcatgttaa ccg	23
5	<210> 9 <211> 31 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 9 gaagtggctg atgccgggat tgaagaatgg g	31
15	<210> 10 <211> 31 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 10 gggttacgtt tcagtgaggc gcgttctgcg g	31
25	<210> 11 <211> 31 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 11 tgcagcggcg cacgatggcg acgttccgcc g	31
30	<210> 12 <211> 31 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 12 cacgatgacg accattcatg cctatactgg c	31
40	<210> 13 <211> 40 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 13 catattccc tcaaagaata taaaaaagaa caattaacgc	40

	<210> 14 <211> 31 <212> ADN <213> artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 14 tatgttcacg cgatggcgca ccagctgggc g	31
10	<210> 15 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
15	<400> 15 ccccggaatc agaggaatag tccc	24
20	<210> 16 <211> 29 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 16 ggtagactc cactactgag gcgtgggcg	29
25	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 17 gcatcagca ggcttagcgc	20
35	<210> 18 <211> 23 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
40	<400> 18 gggtattgtg gcatgttaa ccg	23
	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 19 cgacaattgg attcaccacg	20
5	<210> 20 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 20 gcggtattga aaggttggtg c	21
15	<210> 21 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
20	<400> 21 ccgtgagaag aatcgcgatc g	21
	<210> 22 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 22 gcgtagtcgt gtaagtatcg c	21
30	<210> 23 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
35	<400> 23 cattccggt ggtgcgattg c	21
	<210> 24 <211> 29 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 24 gccacagccg gaatcact tggttggg	29

	<210> 25	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 25	
	cgtaacacc aacttcgtcc catttcagg	29
10	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
15	<400> 26	
	ggcaattacc ctgcagctac cgg	23
	<210> 27	
	<211> 25	
	<212> ADN	
20	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 27	
	ccgatggatg atctgtaga ggcgg	25
25	<210> 28	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido	
	<400> 28	
	gcgtaacctt tccctggaa cg	22
	<210> 29	
	<211> 24	
35	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 29	
40	gcgttgctgg agcaacctgc cagc	24
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> artificial	

ES 2 525 796 T3

	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 30 gcatgggtaa acttaaggcg	20
5	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 31 taatcaccaa cgtatcgggc	20
15	<210> 32 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 32 cgcggcttg tccggtaacg g	21
25	<210> 33 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 33 tcgggctatt taaccgtag tgcc	24
30	<210> 34 <211> 100 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 34 gaaactcgcc gtttatagca caaaacagta cgacaagaag tacctgcaac aggtgaacga	60
	gtcctttggc tttgagctgg tgtaggctgg agctgcttcg	100
40	<210> 35 <211> 101 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	

ES 2 525 796 T3

<400> 35
 ttaaaccagt tcgttcgggc aggtttcgcc tttttccaga ttgcttaagt tttgcagcgt 60
 agtctgagaa atactggca gcatatgaat atcctcctta g 101

5 <210> 36
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 36
 ccccgacat tcttatcgtt gaagacgagt tggtaacacg caacacgttg aaaagtattt 60
 10 tcgaagcggga aggctatgtg taggctggag ctgcttcg 98

<210> 37
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 37
 ccagatcacc gcagaagcga taaccttcac cgtgaatggt ggcgatgatt tccggcgtat 60
 ccggcgtaga ttcgaaatgc atatgaatat cctccttag 99

20 <210> 38
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

25 <400> 38
 ctctcaca aaa ttcgctcaaa taataaaca taaactctgt tttttgatct caccggtaa 60
 agtcgcctat cttttcagct gtaggctgga gctgcttcg 99

<210> 39
 <211> 100
 <212> ADN
 30 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 39
 gcaacttcaa acgcgacgg ataacgggt taatactccc caccagcatc attaatccgg 60
 ttttaaagta accatgcagc catatgaata tcctccttag 100

35 <210> 40
 <211> 124
 <212> ADN
 <213> artificial

ES 2 525 796 T3

<220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 40
 ggggctgacc ttcgctgttg aaccgattaa gctggcgcta tctgaatcgc ttgaaggttt 60
 gaataaatga tcacactggc tcaccttcgg gtgggccttt ctgccatag aatatcctcc 120
 ttag 124

5 <210> 41
 <211> 106
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 41
 gcgaataaag gaagatggcc gccccgcagg gcagcaggtc tgtgaaacag tatagagatt 60
 catcggcaca aaggctttgc tttttgtgta ggctggagct gcttcg 106

15 <210> 42
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 42
 agtcatatat tccaccagct atttgttagt gaataaaagc cacacattat tcgagccgga 60
 20 tgattaatag tcaacagctc tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 43
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 43
 gctcacatta cgtgactgat tctaacaaaa cattaacacc aactggcaaa attttgtccc 60
 atatgaatat cctccttag 79

30 <210> 44
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

35 <400> 44
 cgcgcggggt gccaacgttg tacgtatgaa cttttctcac ggctcgctg aagatcacia 60
 aatgcgcgcg gataaagttc gtgtaggctg gagctgcttc g 101

ES 2 525 796 T3

<210> 45
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 45
 cgccgcatcc ggcaacgtac ttactctacc gttaaatac gcgtggtatt agtagaacc 60
 acggtactca tcacgtcgcc ccatatgaat atcctcetta g 101

10 <210> 46
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

15 <400> 46
 cccatccttc tcaacttaaa gactaagact gtcataaaaa agacccaaat tgtttgacc 60
 atcggaccga aaaccgaatg taggctggag ctgcttcg 98

<210> 47
 <211> 99
 <212> ADN
 20 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 47
 ggacgtgaac agatgcggtg ttagtagtgc cgctcgttac cagtgcacca gaaaccataa 60
 ctacaacgtc acctttgtgc atatgaatat cctccttag 99

25 <210> 48
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 30 <223> Oligonucleótido

<400> 48
 cgagtaagtt agtactggtt ctgaactgcg gtagttcttc actgaaattt gccatcatcg 60
 atgcagtaaa tggatgaagag tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 49
 <211> 97
 35 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

ES 2 525 796 T3

	<400> 49		
	gctgctgtgc agactgaatc gcagtcagcg cgatgggtgta gacgatatcg tcaaccagtg	60	
	cgccacggga caggtcgcat atgaatatcc tccttag	97	
	<210> 50		
	<211> 99		
5	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 50		
	ccttagccag tttgttttcg ccagttcgat cacttcatca ccgctccgc tgatgattgc	60	
10	gcgagcagata tacaggctgc atatgaatat cctccttag	99	
	<210> 51		
	<211> 102		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 51		
	cggttgcagc ttatatcgcc aaaacactcg aatcggcagg ggtgaaacgc atctggggag	60	
	tcacaggcga ctctctgaac ggtgtaggct ggagctgctt cg	102	
	<210> 52		
20	<211> 41		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> promotor sintético		
25	<400> 52		
	gagctgttga cgattaaatca tccggctcga ataatgtgtg g	41	
	<210> 53		
	<211> 65		
30	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 53		
	ccttttattc actaacaat agctgggtgga atatatgtcc aacaatggct cgtcaccgct	60	
	ggtgc	65	
35	<210> 54		
	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
40	<223> Oligonucleótido		

ES 2 525 796 T3

	<400> 54 aatcgcaagc ttgaatccgg ttattcttc agtcagcca ggc	43
5	<210> 55 <211> 65 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Oligonucleótido	
10	<400> 55 gcaccagcgg tgacgagcca ttgttgaca tatattccac cagctatttg ttagtgaata aaagg	60 65
15	<210> 56 <211> 33 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Oligonucleótido	
20	<400> 56 acgtcccggg caagccaaa ggaagagtga ggc	33

REIVINDICACIONES

- 5
1. Método para la preparación de una cepa de microorganismo evolucionada para la producción de 1,2-propanodiol a partir de una fuente de carbono, comprendiendo dicho método:
- hacer crecer una cepa inicial bajo presión selectiva en un medio de crecimiento apropiado, comprendiendo dicha cepa bacteriana una atenuación de la expresión del gen *tpiA* y una atenuación de la expresión de al menos uno de los genes involucrados en la conversión de metilglicoxal en lactato, con el objetivo de promover la evolución de dicha cepa inicial,
 - 10 - seleccionar y aislar la cepa evolucionada que presenta una tasa de producción de 1,2-propanodiol incrementada,
 - reconstruir un gen *tpiA* funcional en la cepa evolucionada.
- 15
2. Método según la reivindicación 1, en el que el gen involucrado en la conversión de metilglicoxal a lactato se selecciona de entre el grupo que consiste en: *gloA*, *aldA* y *aldB* y combinaciones de los anteriores.
- 20
3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la cepa inicial comprende asimismo la atenuación de la expresión de al menos uno de los genes seleccionados de entre el grupo que consiste en *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*, *edd* y *eda*.
- 25
4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que además la cepa inicial comprende la atenuación de al menos uno de los genes seleccionados de entre el grupo que consiste en *arcA* y *ndh*.
- 30
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la cepa evolucionada se selecciona y se aísla en base a su tasa de producción de 1,2-propanodiol, incrementada en al menos 20% en comparación con la tasa de producción de la cepa inicial.
- 35
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cepa inicial se selecciona de entre el grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la cepa inicial se selecciona de entre el grupo que consiste en Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Streptomyetaceae y Corynebacteriaceae.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la cepa inicial es *Escherichia coli* o *Clostridium acetobutylicum*.

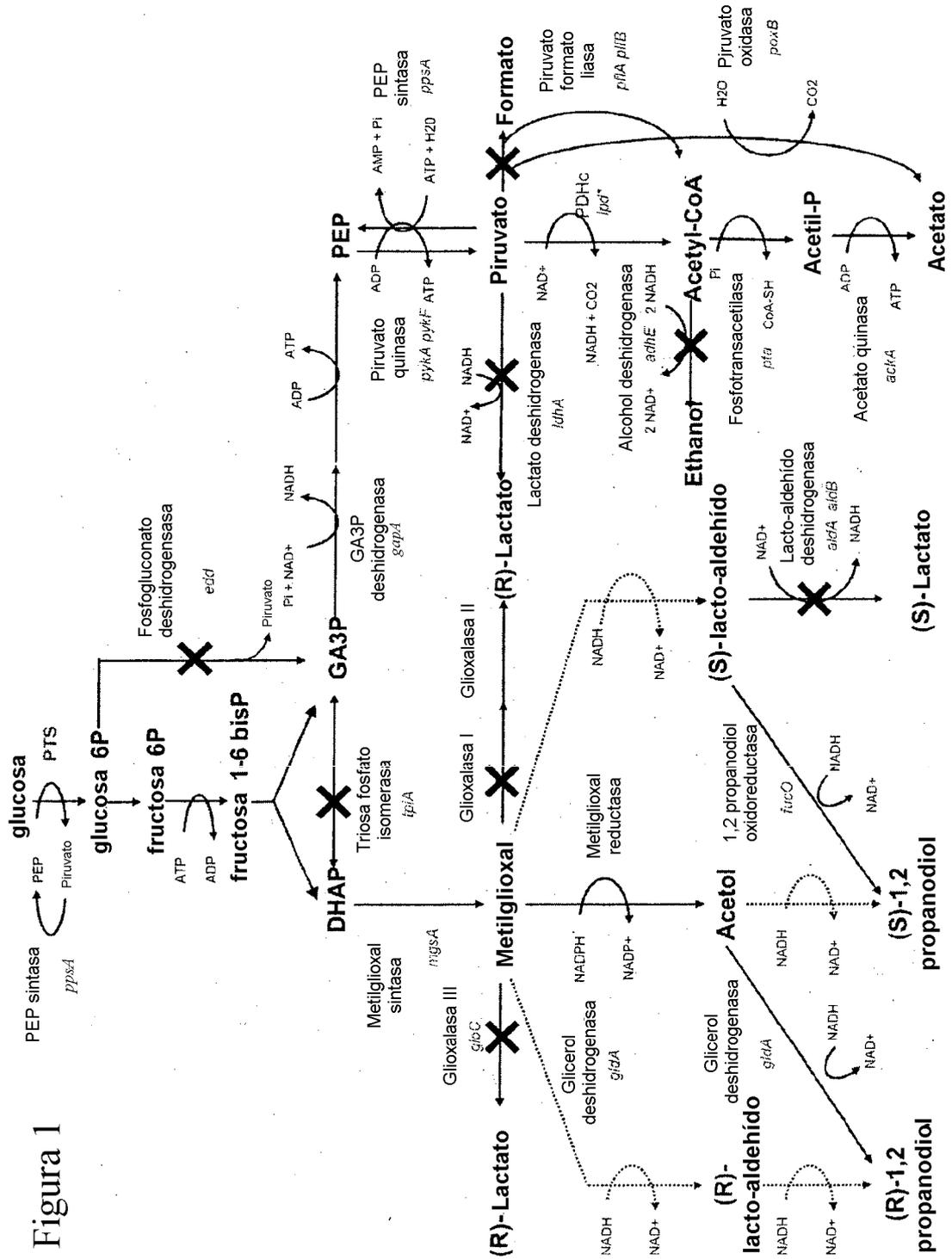


Figura 1