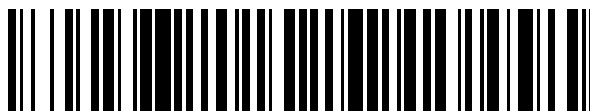


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 003**

51 Int. Cl.:

C12P 7/18 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2009 E 09801721 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2379730**

54 Título: **Método para la preparación de dioles**

30 Prioridad:

31.12.2008 EP 08173129
31.12.2008 US 141699 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2015

73 Titular/es:

METABOLIC EXPLORER (100.0%)
Biôpole Clermont-Limage
63360 Saint Beuzire, FR

72 Inventor/es:

SOUCAILLE, PHILIPPE y
BOISART, CÉDRIC

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 549 003 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la preparación de dioles.

- 5 La presente invención se refiere a un nuevo método para la preparación biológica de un diol que comprende cultivar un microorganismo genéticamente modificado para la bioproducción de un diol alifático, en el que el microorganismo comprende una vía metabólica para la descarboxilación de un metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático con dos enzimas: una enzima que presenta una actividad ácido 2-ceto descarboxilasa codificada por el gen RND de *Lactococcus lactis* y una enzima que presenta una actividad hidroxi aldehído reductasa codificada por el gen yqhD de *E. coli*. La invención se refiere asimismo a un microorganismo modificado para la producción de un diol alifático.

Antecedentes

- 15 La producción fermentativa de dioles cultivando microorganismos que producen dichos dioles es conocida en la técnica, incluyendo la producción fermentativa con microorganismos genéticamente modificados para una producción mejorada de los dioles. La producción de dichos dioles se describe, entre otros, en los siguientes documentos: WO 1996/035796, WO 2001/012833, WO 2004/033646, patente US nº 7.267.972. En particular, la producción de 1,3-propanodiol ya ha sido descrita, involucrando enzimas dependientes de la vitamina B12, haciendo así el procedimiento de producción muy costoso.

- 20 Por ejemplo Nakamura CE et al, Curr Opin Biotechnol., 2003; Act; 14(5): 454-9 describen la producción de 1,3-propanodiol a partir de D-glucosa mediante cepas de *E. coli* genomanipuladas que, entre otras, sobreexpresa la oxidorreductasa endógena codificada por el gen yqhD.

- 25 El gen yqhD se ha utilizado asimismo para la producción fermentativa de 1,4-butanodiol (documento WO 2008/115840).

- 30 Existe una necesidad continua de soluciones alternativas de microorganismos modificados, ya sea para producir dioles a partir de fuentes renovables de carbono o tener una mejora potencial en la producción de los dioles, particularmente con vías independientes de vitamina B12, o ambos.

- 35 Por ejemplo, Nakamura CE et al., Curr Opin Biotechnol. 2003; Act; 14(5): 454-9 describen la producción de 1,3-propanodiol a partir de D-glucosa mediante unas cepas de *E. coli* genomanipuladas, que entre otras, sobreexpresa la oxidorreductasa endógena codificada por el gen yqhD.

- 40 El gen yqhD se ha utilizado asimismo para la producción fermentativa de 1,4-butanodiol (documento WO 2008/115840). Una enzima independiente de la vitamina B12 es por ejemplo la alfa-ceto isovalerato descarboxilasa codificada por el gen KivD de *Lactococcus lactis*. Esta enzima sin embargo únicamente se ha utilizado hasta el momento para la producción de alcoholes superiores (Atsumi S et al., Nature 2008; 451(7174):86-90). Estas mejoras técnicas pueden ser sobre el rendimiento total del producto que se produce sobre la base de la energía necesaria para dicha producción y con el tiempo, el nivel de impurezas y subproductos que se deben controlar específicamente para el aislamiento del producto y su comercialización y uso adicional.

Breve descripción de la invención

- 45 La presente invención se refiere a un microorganismo genéticamente modificado para la bioproducción de un diol alifático, en donde el microorganismo comprende una vía metabólica para la descarboxilación de un metabolito de ácido hidroxi-2-ceto alifático con una enzima que tiene una actividad ácido 2-ceto descarboxilasa, codificada por el gen RND de *Lactococcus lactis*, el producto obtenido a partir de dicho paso de descarboxilación es reducido aún más en la enzima diol alifático correspondiente que tiene una actividad hidroxi aldehído reductasa, codificada por el gen yqhD de *E. coli* y en donde el microorganismo es genéticamente modificado para la producción mejorada de dicho metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático.

- 50 El microorganismo de la invención se selecciona generalmente de entre el grupo que consiste en una bacteria, levadura o un hongo. Preferentemente, el microorganismo se selecciona de entre *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomyetaceae* y *Corynebacteriaceae*.

- 55 Se describe en la presente memoria un microorganismo que comprende un gen endógeno que codifica para una actividad ácido 2-ceto descarboxilasa. Preferentemente se selecciona de entre *Saccharomyces cerevisiae* (Pdc1, Pdc5, Pdc6, Aro10, Thi3); *Lactococcus lactis* (Kivd); *Clostridium acetobutylicum* (Pdc); *Arabidopsis thaliana* (Pdc2, Pdc3); *Pichia stipitis* (Pdc1, Pdc2, Aro10); *Zymomonas mobilis* (Pdc); *Mycobacterium tuberculosis*. Este microorganismo que tiene actividad ácido 2-ceto descarboxilasa endógeno se puede modificar aún más para aumentar la expresión del gen endógeno que codifica el ácido 2-ceto descarboxilasa.

- 65 Se describe asimismo un microorganismo que no comprende un gen endógeno que codifica un ácido 2-ceto descarboxilasa. Dicho microorganismo que carece de ácido 2-ceto descarboxilasa endógeno se selecciona

preferentemente de entre *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum* o *Bacillus subtilis*. Para tales microorganismos, el microorganismo de la invención comprende un gen heterólogo que codifica un ácido 2-ceto descarboxilasa.

Se describe asimismo un microorganismo que comprende un gen endógeno que codifica una actividad hidroxialdehído reductasa. Preferentemente se selecciona de entre *Escherichia coli* (yqhD, fucO, dkgA, dkgB); *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2, ...); y todos los organismos que tienen por lo menos una enzima que tiene actividad aldehído reductasa o actividad alcohol deshidrogenasa. Este microorganismo que tiene actividad hidroxialdehído reductasa endógena se puede modificar aún más para aumentar la expresión del gen endógeno que codifica la hidroxialdehído reductasa.

El diol alifático producido con los microorganismos de la invención es un diol alifático que presenta una cadena de alquilo lineal o ramificada que comprende de 2 a 6 átomos de carbono, preferentemente 2, 3 o 4 átomos de carbono.

En una forma de realización preferida, el diol alifático es etilenglicol y el metabolito de ácido hidroxil-2-ceto alifático es hidroxipiruvato.

En otra forma de realización preferida, el diol alifático es 1,3-propanodiol y el metabolito de ácido hidroxil-2-ceto alifático es 4-hidroxil-2-cetobutirato.

En otra forma de realización preferida, el diol alifático es 1,4-butanodiol y el metabolito de ácido hidroxil-2-ceto alifático es 5-hidroxil-2-cetopentanoato.

La presente invención se refiere también a un método para la bioproducción de un diol alifático, que comprende las etapas siguientes:

- cultivar un microorganismo de la invención como se describe anteriormente y a continuación en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y
- recuperar el diol alifático del medio de cultivo.

De acuerdo con la forma de realización preferida de la invención, el diol es purificado adicionalmente.

Descripción detallada de la invención

Microorganismos

El microorganismo de la invención es un microorganismo que es genéticamente modificado o manipulado genéticamente. Esto significa, de acuerdo con el significado usual de estos términos, que el microorganismo de la invención no se encuentra en la naturaleza y es modificado ya sea por introducción o delección de nuevos elementos genéticos. Asimismo puede ser transformado forzando el desarrollo y evolución de nuevas vías metabólicas al combinar mutagénesis dirigida y evolución bajo presión de selección específica (ver por ejemplo, el documento WO 2004/076659).

De acuerdo con la invención, el término "microorganismo" designa una bacteria, levadura o un hongo. Preferentemente, el microorganismo se selecciona de entre *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae* y *Corynebacteriaceae*. Más preferentemente, el microorganismo es una especie de *Escherichia*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Salmonella* o *Corynebacterium*. Todavía más preferentemente el microorganismo es ya sea la especie *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum* o *Clostridium acetobutylicum* o *Bacillus subtilis*.

Un microorganismo puede expresar genes exógenos si estos genes son introducidos en el microorganismo con todos los elementos que permiten su expresión en el microorganismo hospedero. Transformar microorganismos con ADN exógeno es una tarea de rutina para el experto en la materia.

Unos genes exógenos pueden ser integrados en el genoma del hospedero, o ser expresados extracromosómicamente por plásmidos o vectores. Diferentes tipos de plásmidos son conocidos por el experto en la materia, que difieren con respecto a su origen de replicación y su número de copias en la célula.

Unos elementos importantes para controlar la expresión de genes son los promotores. En una forma de realización preferida de la invención, los genes pueden ser expresados usando promotores con diferente fuerza, que puede ser inducible. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos. El experto en la materia conoce cómo seleccionar los promotores más convenientes, por ejemplo, promotores *P_{trc}*, *P_{tac}*, *P_{lac}* o el promotor lambda cl son ampliamente usados.

En las formas de realización específicas, los genes endógenos pueden ser también modificados para modular su

expresión y/o actividad, introduciendo ya sea mutaciones en la secuencia de codificación para modificar el producto de gen o introduciendo secuencias heterólogas además de o en reemplazo de los elementos reguladores endógenos. La modulación de un gen endógeno puede ser de dos maneras: sobrerregular y/o aumentar la actividad del producto de gen por una parte, o subregular y/o reducir la actividad del producto de gen endógeno por otra parte.

El término "atenuación de un gen" de acuerdo con la invención denota la supresión parcial o completa de la expresión de un gen, que se dice después que es "atenuado". Esta supresión de expresión puede ser ya sea una inhibición de la expresión del gen, una delección de toda o parte de la región promotora necesaria para la expresión de genes, una delección en la región de codificación del gen, o el reemplazo del promotor tipo silvestre por un promotor natural o sintético más débil. Preferentemente, la atenuación de un gen es esencialmente la delección completa de ese gen, que puede ser reemplazado por un gen marcador de selección que facilita la identificación, el aislamiento y la purificación de las cepas de acuerdo con la invención. Un gen es inactivado preferentemente por la técnica de 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).

En otras formas de realización de la invención, las secuencias endógenas pueden ser también inactivadas o eliminadas, para favorecer la nueva vía metabólica.

Todas las técnicas para transformar los microorganismos, y elementos reguladores usados para aumentar la producción de la proteína de la invención son bien conocidos en la técnica y se encuentran disponibles en la literatura, incluyendo las solicitudes de patente de la solicitante sobre la modificación de vías de biosíntesis en diversos microorganismos, incluyendo los documentos WO 2008/052973, WO 2008/052595, WO 2008/040387, WO 2007/144346, WO 2007/141316, WO 2007/077041, WO 2007/017710, WO 2006/082254, WO 2006/082252, WO 2005/111202, WO 2005/073364, WO 2005/047498, WO 2004/076659, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia.

Genes y actividades enzimáticas

En la descripción de la presente invención, actividades enzimáticas son también designadas por referencia a los genes que codifican para las enzimas que tienen tal actividad. Excepto que se mencione otra cosa, los genes y proteínas son generalmente identificados usando las denominaciones de genes de *Escherichia coli*. Sin embargo, el uso de estas denominaciones tiene un significado más general de acuerdo con la invención y cubre todos los genes y proteínas correspondientes en otros organismos, más en particular microorganismos, homólogos funcionales, variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos genes y proteínas.

Los genes que son identificados en la presente solicitud se presentan en la figura 4 con su número de acceso.

Usando las referencias de la Nomenclatura de enzimas IUBMB para actividades enzimáticas conocidas, los expertos en la materia pueden determinar las mismas actividades enzimáticas en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, etc. Este trabajo de rutina se hace de manera favorable usando secuencias consenso que se pueden determinar llevando a cabo alineamientos de secuencia con proteínas derivadas de otros microorganismos.

Los métodos para la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias de proteínas son conocidos para el experto en la materia. Por ejemplo, se puede hacer después de alineamiento de las secuencias usando el software CLUSTALW disponible en el sitio web <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> con los parámetros predeterminados indicados en el sitio web. A partir del alineamiento, el cálculo del porcentaje de identidad se puede hacer fácilmente registrando el número de residuos idénticos en la misma posición en comparación con el número total de residuos. De manera alternativa, el cálculo automático se puede hacer usando, por ejemplo, los programas BLAST disponibles en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros predeterminados indicados en el sitio web.

PFAM (base de datos de familias de proteínas de alineamientos y modelos de Markov ocultos; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) representa una gran colección de alineamientos de secuencias de proteínas. Cada PFAM hace posible visualizar múltiples alineamientos, ver dominios de proteínas, evaluar la distribución entre organismos, obtener acceso a otras bases de datos y visualizar estructuras de proteínas conocidas.

Los COG (conjuntos de grupos ortólogos de proteínas; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen comparando secuencias de proteínas a partir de 66 genomas completamente secuenciados que representan 30 líneas filogénicas principales. Cada COG se define a partir de por lo menos tres líneas, lo que permite la identificación de dominios conservados anteriores.

Una proteína que comparte homología con la proteína mencionada se puede obtener a partir de otros microorganismos o puede ser una variante o un fragmento funcional de una proteína natural.

El término "variante funcional o fragmento funcional" significa que la secuencia de aminoácidos del polipéptido puede no estar estrictamente limitada a la secuencia observada en la naturaleza, sino que puede contener aminoácidos

adicionales. El término "fragmento funcional" significa que la secuencia del polipéptido puede incluir menos aminoácido que la secuencia original pero aún suficientes aminoácidos para conferir la actividad enzimática de la secuencia original de referencia. Es bien conocido en la técnica que un polipéptido puede ser modificado por sustitución, inserción, delección y/o adición de uno o más aminoácidos mientras retiene su actividad enzimática. Por ejemplo, la sustitución de un aminoácido en una posición dada por un aminoácido químicamente equivalente que no afecta las propiedades funcionales de una proteína es común. En el contexto de la presente invención, las sustituciones se definen como intercambios dentro de uno de los siguientes grupos:

- residuos alifáticos, no polares o ligeramente polares pequeños: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
- residuos polares con carga negativa y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln
- residuos polares con carga positiva: His, Arg, Lys
- residuos alifáticos, no polares grandes: Met, Leu, Ile, Val, Cys
- residuos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

Se puede esperar que cambios que dan por resultado la sustitución de un residuo con carga negativa por otro (tal como ácido glutámico por ácido aspártico) o un residuo con carga positiva por otro (tal como lisina por arginina) formen un producto funcionalmente equivalente.

Las posiciones en las que los aminoácidos son modificados y el número de aminoácidos sujetos a modificación en la secuencia de aminoácidos no están limitados particularmente. El experto en la materia puede apreciar las modificaciones que pueden ser introducidas sin afectar la actividad de la proteína. Por ejemplo, se puede esperar que modificaciones en la porción N-o C-terminal de una proteína no alteren la actividad de una proteína bajo ciertas circunstancias.

El término "variante" se refiere a polipéptidos sometidos a modificaciones tal como se define anteriormente mientras aún retienen la actividad enzimática original.

El término "codificar" se refiere al proceso mediante el cual un polinucleótido, a través de los mecanismos de transcripción y traducción, produce una secuencia de aminoácidos. Este proceso es permitido por el código genético, el cual es la relación entre la secuencia de bases en el ADN y la secuencia de aminoácidos en las proteínas. Una característica principal del código genético es que es degenerado, lo que significa que un aminoácido puede ser codificado por más de un triplete de bases (un "codón"). La consecuencia directa es que la misma secuencia de aminoácidos puede ser codificado por diferentes polinucleótidos. Es bien conocido por el experto en la materia que el uso de codones puede variar de acuerdo con los organismos. Entre los codones que codifican para el mismo aminoácido, algunos pueden ser usados preferentemente por un microorganismo dado. Por ende, puede ser de interés diseñar un polinucleótido adaptado al uso de codones de un microorganismo particular con el fin de optimizar la expresión de la proteína correspondiente en este organismo.

En algunos casos, genes o enzimas pueden ser designados por el nombre de la actividad. En algunos otros casos, la designación por "actividad" puede significar una combinación de dos o más enzimas que tienen en combinación la actividad deseada. En dicho caso, cada enzima en la combinación puede ser codificada por distintos genes bajo control de diferentes elementos reguladores o una combinación de genes bajo control del mismo operón.

Los genes que codifican una actividad ácido 2-ceto descarboxilasa son bien conocidos en la técnica, incluyendo genes Pdc de diversas especies, y más en particular los genes Pdc1, Pdc5, Pdc6, Aro10 y Thi3 de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen kivD de *Lactococcus lactis*; el gen pdc de *Clostridium acetobutylicum*; los genes Pdc2 y Pdc3 de *Arabidopsis thaliana*; los genes Pdc1, Pdc2 y Aro10 de *Pichia stipitis*; el gen pdc de *Zymomonas mobilis*. La primera subunidad del complejo 2-cetoglutarato descarboxilasa, codificado por el gen sucA de *Escherichia coli*, posee también actividad ácido 2-ceto descarboxilasa, así como la enzima codificada por el gen dxs de *Escherichia coli*. Homólogos funcionales, variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos genes y proteínas están incluidos por la definición.

Los genes que codifican una actividad hidroxí aldehído reductasa son también bien conocidos en la técnica, incluyendo los genes yqhD, fucO, dkgA, dkgB de *Escherichia coli* y los genes ADH1 y ADH2 de *Saccharomyces cerevisiae*. Los homólogos funcionales, variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos genes y proteínas están incluidos por la definición.

Producción fermentativa

La presente invención se refiere además a la producción fermentativa de un diol alifático, que comprende las etapas de:

- cultivar un microorganismo en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y
- recuperar el diol alifático del medio de cultivo.

La fermentación generalmente se lleva a cabo en fermentadores con un medio de cultivo apropiado adaptado al

microorganismo usado, que contiene por lo menos una fuente de carbono simple, y si es necesario cosustratos.

Un 'medio de cultivo apropiado' designa un medio (por ejemplo, medios estériles, líquidos) que comprende nutrientes esenciales o benéficos para el mantenimiento y/o crecimiento de la célula tal como fuentes de carbono o sustrato de carbono, fuentes de nitrógeno, por ejemplo, peptona, extractos de levadura, extractos de carne, extractos de malta, urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y fosfato de amonio; fuentes de fósforo, por ejemplo, fosfato de monopotasio o fosfato de dipotasio; elementos traza (por ejemplo, sales de metal), por ejemplo, sales de magnesio, sales de cobalto y/o sales de manganeso; así como factores de crecimiento tales como aminoácidos, vitaminas, promotores de crecimiento y similares.

Como un ejemplo de medios de cultivo conocidos para *E. coli*, el medio de cultivo puede 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 es definido por Schaefer *et al.* (1999, Anal. Biochem. 270: 88-96).

Como otro ejemplo de un medio de cultivo para *C. glutamicum*, el medio de cultivo puede ser de composición idéntica o similar al medio BMCG (Liebl *et al.*, 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205-210) o a un medio tal como es descrito por Riedel *et al.* (2001, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 573-583).

El término 'fuente de carbono' o 'sustrato de carbono' de acuerdo con la presente invención denota cualquier fuente de carbono que puede ser usada por los expertos en la materia para soportar el crecimiento normal de un microorganismo, incluyendo hexosas (tales como glucosa, galactosa o lactosa), pentosas, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos (tales como sacarosa, celobiosa o maltosa), melaza, almidón o sus derivados, hemicelulosas, glicerol y combinaciones de los mismos. Una fuente de carbono simple especialmente preferida es la glucosa. Otra fuente de carbono simple preferida es sacarosa.

En algunas formas de realización de la invención, el medio de cultivo comprende una fuente de carbono que es un subproducto de otro proceso usando biomasa como material de partida, o eventualmente, el producto de degradación mecánica y/o química y/o enzimática, y en tal caso *in vitro* o *in vivo*, de biomasa, tal como degradación de celulosa.

El microorganismo de la invención es seleccionado y/o modificado de manera favorable para usar la fuente de carbono como fuente única de carbono para crecer en el medio de cultivo.

Los microorganismos seleccionados para crecer en una fuente de carbono específica son conocidos en la técnica, así como las modificaciones que se deben introducir en un microorganismo para permitirle crecer en dicha fuente de carbono específica.

Los expertos en la materia pueden definir las condiciones de cultivo para los microorganismos de acuerdo con la invención. En particular las bacterias son fermentadas a una temperatura entre 20°C y 55°C, preferente mente entre 25°C y 40°C, y más específicamente aproximadamente 30°C para *C. glutamicum* y aproximadamente 37°C para *E. coli*.

Recuperar el diol alifático del medio de cultivo es una tarea de rutina para un experto en la materia.

En un aspecto de la invención, el diol alifático recuperado es purificado adicionalmente.

Los métodos para recuperar un diol de un medio de cultivo y su purificación son conocidos en la técnica y se describen, entre otros, en los siguientes documentos: PCT/EP2008/063287 presentado el 3 de octubre de 2008 y PCT/EP2007/063068 presentado el 30 de noviembre de 2007.

Formas de realización específicas

Otras formas de realización de la invención se describirán a continuación. Los microorganismos son modificados para favorecer tanto la producción del metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático como la transformación en el diol alifático correspondiente del producto obtenido del paso de descarboxilación del mismo metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático.

La descripción a continuación se realiza haciendo referencia a *E. coli*, el cual carece de actividad ácido 2-ceto descarboxilasa endógeno. Por lo tanto, un gen heterólogo que codifica dicha actividad es introducido en el microorganismo.

Las modificaciones del microorganismo para optimizar la vía para producir el metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático y transformar el producto obtenido a partir del paso de descarboxilación del mismo metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático en el diol alifático se hacen también sobre la base de las vías metabólicas conocidas y genes

endógenos de *E. coli*. Sin embargo, el experto en la materia puede usar estrategias similares para introducir o eliminar genes correspondientes en otros microorganismos con genes y vías conocidos.

I. Preparación de etilenglicol

La vía de biosíntesis para la producción de etilenglicol de acuerdo con la invención comprende tres reacciones enzimáticas empezando con transformación del precursor 3-fosfohidroxipiruvato (precursor para serina). Primero una actividad fosfatasa permite la conversión de fosfohidroxipiruvato en hidroxipiruvato. El hidroxipiruvato es después transformado en glicolaldehído con una actividad ácido 2-ceto descarboxilasa. Por último, una actividad hidroxil aldehído reductasa permite la conversión de glicolaldehído en etilenglicol. Otra vía para la producción de etilenglicol empieza a partir de L-serina como precursor. Primero una actividad transaminasa o aminoácido oxidasa permite la conversión de serina en hidroxipiruvato. Las siguientes dos etapas son similares a la primera vía descrita anteriormente.

La vía de biosíntesis global está representada en la figura 1.

La presente invención proporciona un método para la producción fermentativa de etilenglicol, sus derivados o precursores, que comprende: cultivar un microorganismo, particularmente una bacteria, en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y recuperar etilenglicol del medio de cultivo.

En una forma de realización preferida, el método se lleva a cabo con un microorganismo, particularmente una bacteria, que contiene por lo menos un gen que codifica un polipéptido con actividad ácido 2-ceto descarboxilasa y un gen que codifica un polipéptido con actividad hidroxil aldehído reductasa. Esos genes pueden ser exógenos o endógenos, y pueden ser expresados cromosómica o extracromosómicamente.

En otra forma de realización de la invención, el método se realiza con un microorganismo, particularmente una bacteria, en la cual la disponibilidad del intermediario 3-fosfoglicerato es incrementada. Preferentemente, el incremento se obtiene atenuando el nivel de expresión de genes que codifican fosfoglicerato mutasas, en particular uno o ambos genes *gpmA* y *pgmL*. Esto se puede hacer reemplazando el promotor tipo silvestre de estos genes por un promotor más débil, o mediante el uso de un elemento que desestabilice el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa de los genes se puede realizar también mediante la delección de las secuencias de ADN correspondientes. La invención se refiere además al microorganismo usado en esta forma de realización particular de la invención, es decir, un microorganismo, particularmente una bacteria que presenta una disponibilidad incrementada de 3-fosfoglicerato, en particular un microorganismo, preferentemente una bacteria, en la cual la expresión de los genes que codifican para fosfoglicerato mutasas es atenuada, preferentemente la expresión de uno o ambos genes *gpmA* y *pgmL*.

En otra forma de realización, el método se realiza con un microorganismo, particularmente una bacteria, en la cual el flujo a la vía de biosíntesis de serina es estimulado. Esto se puede lograr incrementando el nivel de expresión de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa y/o fosfoserina aminotransferasa, codificada por los genes *serA* y *serC* respectivamente. Incrementar el nivel de expresión de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa y/o fosfoserina aminotransferasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que impulsen la expresión de los genes *serA* y/o *serC*, incrementando el número de copias en la célula o introduciendo mutaciones en los genes *serA* y/o *serC* que incrementen la actividad de las proteínas correspondientes. La expresión del gen *serA* se puede incrementar también reemplazando el gen *lrp* tipo silvestre (que codifica la proteína reguladora de respuesta a leucina) por un alelo mutado con *lrp* (tal como el alelo *lrp-1* correspondiente a una sustitución GLU114ASP en la proteína *lrp*) que produce la activación constitutiva de la transcripción del gen *serA*. La invención se refiere también al microorganismo, en particular una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En una forma de realización particular de la invención se pueden introducir mutaciones en el gen *serA* que reducen la sensibilidad de la proteína *SerA* a la serina inhibidora de retroalimentación (alelos desensibilizados a retroalimentación) y permiten así una actividad incrementada en presencia de serina. Los ejemplos de alelos desensibilizados, es decir, alelos insensibles a retroalimentación, han sido descritos en los documentos EP 0 931 833 (Ajinomoto) o EP 0 620 853 (Wacker).

En otra forma de realización el método se realiza con un microorganismo, particularmente una bacteria, en la cual el flujo a la vía de biosíntesis de hidroxipiruvato es estimulado. Este resultado se puede lograr incrementando el nivel de expresión de serina transaminasa o serina oxidasa (para la vía empezando a partir de serina como precursor), o incrementando la expresión de 3-fosfohidroxipiruvato fosfatasa. El incremento del nivel de expresión de serina oxidasa se puede lograr introduciendo y sobreexpresando el gen que codifica para L-aminoácido oxidasa a partir de *R. opacus*, o introduciendo mutaciones en el gen que incrementen la actividad de la proteína correspondiente. Un incremento en la expresión de serina transaminasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que impulsen la expresión del gen *serC* de *E. coli*, incrementando el número de copias en la célula o introduciendo mutaciones en el gen *serC* que incrementen la actividad de la proteína correspondiente. Un incremento de la expresión de 3-fosfohidroxipiruvato fosfatasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que impulsen la expresión del gen *yeaB* o gen *serB* de *E. coli*, incrementando el número de copias en la célula o introduciendo

mutaciones en el gen *yeaB* o el gen *serB* que incrementen la actividad de las proteínas correspondientes. Un incremento de la expresión de 3-fosfohidroxipiruvato fosfatasa se puede lograr también introduciendo y sobreexpresando el gen *GPP2* de *S. cerevisiae*, o introduciendo mutaciones en el gen *GPP2* que incrementen la actividad de la proteína correspondiente. La invención se refiere también al microorganismo, particularmente una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En otra forma de realización de la invención, el microorganismo, particularmente una bacteria, es modificado para presentar un nivel atenuado de conversión de serina a otros compuestos distintos de etilenglicol. Este resultado se puede obtener atenuando el nivel de enzimas que consumen serina como serina deaminasas (codificadas por *sdaA* y *sdaB* y *tdcG*), serina transacetilasa (codificada por *cysE*), triptófano sintasa (codificada por *trpAB*) o serina hidroximetiltransferasa (codificada por *glyA*). Estos genes pueden ser atenuados reemplazando el promotor natural por un promotor de menor fuerza o por elementos que desestabilicen el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen se puede lograr también mediante una delección de la secuencia de ADN correspondiente. Asimismo la invención se refiere al microorganismo, en particular una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En otra forma de realización de la invención, el microorganismo, particularmente una bacteria, es modificado para presentar un nivel atenuado de conversión de hidroxipiruvato a otros compuestos distintos de glicolaldehído. Este resultado se puede obtener atenuando el nivel de enzimas que consumen hidroxipiruvato como hidroxipiruvato reductasa (codificada por *ghrA*) o hidroxipiruvato isomerasa (codificada por *hyi*). Estos genes pueden ser atenuados reemplazando el promotor natural por un promotor de menor fuerza o por elementos que desestabilicen el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen se puede lograr también mediante una delección de la secuencia de ADN correspondiente. La invención se refiere también al microorganismo, particularmente una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En otra forma de realización de la invención, el microorganismo, en particular una bacteria, es modificado para presentar un nivel atenuado de conversión de glicolaldehído a otros compuestos distintos de etilenglicol. Esto se puede obtener atenuando el nivel de enzimas que consumen glicolaldehído como hidroxitreonina aldolasa (codificada por *ltaE*) o glicolaldehído deshidrogenasa (codificada por *aldA*, *aldB*). La atenuación de estos genes se puede hacer reemplazando el promotor natural por un promotor de menor fuerza o por elementos que desestabilicen el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si se necesita, la atenuación completa del gen se puede lograr también por medio de una delección de la secuencia de ADN correspondiente. Asimismo la invención se refiere al microorganismo, en particular una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En un aspecto de la invención, la eficiencia de la importación de azúcar es incrementada, ya sea usando un sistema de importación de azúcar que no depende de fosfoenolpiruvato (PEP) como donador de fósforo como *galP* que es conocido que transporta glucosa, o proveyendo más fosfoenolpiruvato (PEP) al sistema de fosfotransferasa de azúcar. Existen diversos medios que se pueden usar para incrementar la disponibilidad de PEP en un microorganismo. En particular, esto se puede lograr atenuando la reacción $\text{PEP} \rightarrow \text{piruvato}$. Preferentemente, por lo menos un gen seleccionado de entre *pykA* y *pykF*, que codifican piruvato cinasa, es atenuado en dicha cepa con el fin de obtener este resultado. Otra manera de incrementar la disponibilidad de PEP es favorecer la reacción $\text{piruvato} \rightarrow \text{PEP}$. Esto se puede lograr incrementando la actividad de fosfoenolpiruvato sintasa la cual cataliza la reacción anterior. Esta enzima es codificada por el gen *ppsA*. Por lo tanto, en el microorganismo, la expresión del gen *ppsA* es preferentemente incrementada. Ambas modificaciones pueden estar presentes en el microorganismo de manera simultánea.

II. Preparación de 1,3-propanodiol

La vía de biosíntesis para la producción de 1,3-propanodiol de acuerdo con la invención comprende tres reacciones enzimáticas empezando con transformación del precursor L-homoserina (obtenido de L-aspartato). Primero una actividad homoserina transaminasa o una actividad homoserina oxidasa permite la conversión de L-homoserina en 4-hidroxi-2-cetobutirato. Una segunda actividad ácido 2-ceto descarboxilasa permite la conversión de 4-hidroxi-2-cetobutirato en 3-hidroxi-2-oxopropionaldehído. 3-hidroxi-2-oxopropionaldehído es después convertido en 1,3-propanodiol con una actividad hidroxialdehído reductasa.

La vía de biosíntesis global está representada en la figura 2.

La presente invención proporciona un método para la producción fermentativa de 1,3-propanodiol, sus derivados o precursores, que comprende: cultivar un microorganismo, particularmente una bacteria, en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y recuperar 1,3-propanodiol del medio de cultivo.

En una forma de realización preferida, el método se lleva a cabo con un microorganismo, particularmente una bacteria, que contiene por lo menos un gen que codifica un polipéptido con actividad ácido 2-ceto descarboxilasa y un gen que codifica un polipéptido con actividad hidroxialdehído reductasa. Esos genes pueden ser exógenos o endógenos, y pueden ser expresados cromosómicamente o extracromosómicamente.

En otra forma de realización, el método se realiza con un microorganismo, particularmente una bacteria, cuyo flujo en la vía de biosíntesis de oxaloacetato es estimulado; este resultado se puede lograr incrementando el nivel de expresión de fosfoenolpiruvato carboxilasa, codificada por el gen *ppc*. Incrementar la expresión de fosfoenolpiruvato carboxilasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que impulsen la expresión del gen *ppc*, incrementando el número de copias en la célula o introduciendo mutaciones en el gen *ppc* que incrementen la actividad de la proteína correspondiente. La disponibilidad del producto intermediario oxaloacetato se puede incrementar atenuando el nivel de expresión de genes que codifican para fosfoenolpiruvato carboxilasa y/o enzimas málicas, codificadas por los genes *pckA* y/o *maeA* y/o *maeB*, respectivamente. Esto se puede hacer reemplazando el promotor tipo silvestre de estos genes por un promotor más débil, o mediante el uso de un elemento que desestabilice el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa de los genes se puede realizar también mediante la delección de las secuencias de ADN correspondientes. La invención se refiere también al microorganismo, particularmente una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención, es decir, un microorganismo, particularmente una bacteria, que presenta una disponibilidad incrementada del oxaloacetato.

En otra forma de realización, el método se realiza con un microorganismo, particularmente una bacteria, en la cual el flujo a la vía de biosíntesis de homoserina es estimulado. Esto se puede lograr incrementando la expresión de aspartocinasa y homoserina deshidrogenasa y/o aspartato semialdehído deshidrogenasa, codificadas por los genes *thrA* y *asd*, respectivamente. Incrementar la expresión de aspartocinasa y homoserina deshidrogenasa y/o aspartato semialdehído deshidrogenasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que impulsen la expresión de los genes *thrA* y/o *asd*, incrementando el número de copias en la célula o introduciendo mutaciones en los genes *thrA* y/o *asd* que incrementen la actividad de las proteínas correspondientes. La invención se refiere también al microorganismo, en particular una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En una forma de realización particular de la invención se pueden introducir mutaciones en el gen *thrA* que reducen su sensibilidad a la treonina inhibidora de retroalimentación (alelos desensibilizados a retroalimentación) y permiten así una actividad incrementada en presencia de treonina.

En otra forma de realización el método se realiza con un microorganismo, particularmente una bacteria, en la cual el flujo a la vía de biosíntesis de 4-hidroxi-2-cetobutirato es estimulado. Este resultado se puede lograr incrementando la expresión de homoserina transaminasa u homoserina oxidasa. Incrementar la expresión de homoserina oxidasa se puede lograr introduciendo y sobreexpresando el gen que codifica para L-aminoácido oxidasa a partir de *R. opacus*, o introduciendo mutaciones en el gen que incrementen la actividad de la proteína correspondiente. Incrementar el nivel de expresión de homoserina transaminasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que impulsen la expresión del gen *serC* de *E. coli*, incrementando el número de copias en la célula o introduciendo mutaciones en el gen *serC* que incrementen la actividad de la proteína correspondiente. La invención se refiere también al microorganismo, particularmente una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En otra forma de realización de la invención, el microorganismo, particularmente una bacteria, es modificado para presentar un nivel atenuado de conversión de homoserina a otros compuestos distintos de 1,3-propanodiol. Este resultado se puede obtener atenuando el nivel de enzimas que consumen homoserina como homoserina cinasa y treonina sintasa (codificadas por *thrB* y *thrC*), homoserina O-transsuccinilasa (codificada por *metA*) o dihidrodipicolinato sintasa (codificada por *dapA*). Estos genes pueden ser atenuados reemplazando el promotor natural por un promotor más débil o por elementos que desestabilicen el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen se puede lograr también mediante la delección de la secuencia de ADN correspondiente. Asimismo la invención se refiere al microorganismo, en particular una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En otra forma de realización de la invención, el microorganismo, particularmente una bacteria, es modificado para presentar un nivel atenuado de conversión de 3-hidroxi-2-oxopropionaldehído a otros compuestos distintos de 1,3-propanodiol. Esto se puede obtener atenuando el nivel de enzimas que consumen 3-hidroxi-2-oxopropionaldehído como 3-hidroxi-2-oxopropionaldehído deshidrogenasa (codificada por *aldA*, *aldB*). Estos genes pueden ser atenuados reemplazando el promotor natural por un promotor más débil o por elementos que desestabilicen el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen se puede lograr también mediante la delección de la secuencia de ADN correspondiente. La invención se refiere también al microorganismo, particularmente una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En un aspecto de la invención, la eficiencia de la importación de azúcar es incrementada, ya sea usando un sistema de importación de azúcar que no depende de fosfoenolpiruvato (PEP) como donador de fósforo como aquel codificado por *galP* que se sabe que transporta glucosa, o proveyendo más fosfoenolpiruvato (PEP) al sistema de fosfotransferasa de azúcar. Existen diversos medios que se pueden usar para incrementar la disponibilidad de PEP en un microorganismo. En particular, esto se puede lograr atenuando la reacción $\text{PEP} \rightarrow \text{piruvato}$. Preferentemente, por lo menos un gen seleccionado de entre *pykA* y *pykF*, que codifican piruvato cinasa, es atenuado en dicha cepa con el fin de obtener este resultado. Otra manera de incrementar la disponibilidad de PEP es favorecer la reacción $\text{piruvato} \rightarrow \text{PEP}$. Esto se puede lograr incrementando la actividad de fosfoenolpiruvato sintasa la cual cataliza la

reacción anterior. Esta enzima es codificada por el gen *ppsA*. Por lo tanto, en el microorganismo, la expresión del gen *ppsA* es preferentemente incrementada. Ambas modificaciones pueden estar presentes en el microorganismo de manera simultánea.

5 III. Preparación de 1,4-butanodiol

La vía de biosíntesis para la producción de 1,4-butanodiol de acuerdo con la invención comprende cinco reacciones enzimáticas empezando con la transformación del precursor 2-cetoglutarato (metabolito del ciclo de Krebs).

- 10 Una primera actividad, 4-oxoglutaril-CoA sintetasa, permite la conversión de 2-cetoglutarato en 4-oxoglutaril-CoA. Este compuesto es después convertido en 5-hidroxi-2-cetopentanoato con las combinaciones de dos actividades, primero aldehído deshidrogenasa después alcohol deshidrogenasa ambas codificadas por el gen *adhE2* de *Clostridium acetobutylicum* o *adhE* de *Escherichia coli*. La actividad ácido 2-ceto descarboxilasa permite entonces la conversión de 5-hidroxi-2-oxopentanoato a 4-hidroxibutiraldehído, que es después convertido en 1,4-butanodiol que se basa en actividad hidroxil aldehído reductasa.

La vía de biosíntesis global está representada en la figura 3.

- 20 La presente invención proporciona un método para la producción fermentativa de 1,4-butanodiol, sus derivados o precursores, que comprende: cultivar un microorganismo, particularmente una bacteria, en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y recuperar 1,4-butanodiol del medio de cultivo.

- 25 En una forma de realización preferida, el método se lleva a cabo con un microorganismo, particularmente una bacteria, que contiene por lo menos un gen que codifica un polipéptido con actividad ácido 2-ceto descarboxilasa y un gen que codifica un polipéptido con actividad hidroxil aldehído reductasa. Esos genes pueden ser exógenos o endógenos, y pueden ser expresados cromosómica o extracromosómicamente.

- 30 En otra forma de realización de la invención, el método se realiza con un microorganismo, particularmente una bacteria, en la cual el flujo a la vía de biosíntesis de oxaloacetato es estimulado (entrada del ciclo de Krebs). Esto se puede lograr incrementando la expresión de fosfoenolpiruvato carboxilasa, codificada por el gen *ppc*. Incrementar la expresión de fosfoenolpiruvato carboxilasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que impulsen la expresión del gen *ppc*, incrementando el número de copias en la célula o introduciendo mutaciones en el gen *ppc* que incrementen la actividad de la proteína correspondiente. La disponibilidad del producto intermediario oxaloacetato se puede incrementar también atenuando el nivel de expresión de genes que codifican fosfoenolpiruvato carboxilasa y/o enzimas málicas, codificadas por los genes *pckA* y/o *maeA* y/o *maeB*, respectivamente. Esto se puede hacer reemplazando el promotor tipo silvestre de estos genes por un promotor más débil, o mediante el uso de un elemento que desestabilice el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa de los genes se puede realizar también mediante la delección de las secuencias de ADN correspondientes. La invención se refiere también al microorganismo, particularmente una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención, es decir, un microorganismo, particularmente una bacteria, que presenta una disponibilidad incrementada de 2-cetoglutarato.

- 45 En otra forma de realización el método se realiza con un microorganismo, particularmente una bacteria, en la cual el flujo a la vía de biosíntesis de 2-cetoglutarato es estimulado. Esto se puede lograr incrementando la expresión de citrato sintasa y/o isocitrato deshidrogenasa, codificadas por los genes *gltA* e *icd*, respectivamente. El incremento de la expresión de citrato sintasa y/o isocitrato deshidrogenasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que impulsen la expresión de los genes *gltA* y/o *icd*, incrementando el número de copias en la célula o introduciendo mutaciones en los genes *gltA* y/o *icd* que incrementen la actividad de las proteínas correspondientes. La actividad isocitrato deshidrogenasa es modulada por fosforilación o desfosforilación, reacciones que son catalizadas por AceK. La fosforilación reduce la actividad de Icd y la desfosforilación reactiva la enzima Icd. Por lo tanto, la actividad de la enzima Icd puede ser también controlada introduciendo genes *aceK* mutantes que tienen actividad cinasa reducida o actividad fosfatasa incrementada en comparación con la enzima AceK tipo silvestre. El nivel de actividad AceK puede ser también disminuido atenuando la expresión del gen *aceK*. Esto se puede hacer reemplazando el promotor tipo silvestre del gen por un promotor más débil, o mediante el uso de un elemento que desestabilice el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen se puede realizar también mediante la delección de la secuencia de ADN correspondiente. La disponibilidad del intermediario 2-cetoglutarato se puede incrementar también atenuando la expresión de genes que codifican para 2-cetoglutarato descarboxilasa o succinil-CoA sintetasa y/o isocitrato liasa o malato sintasa, codificados por los genes *sucAB* o *sucCD* y/o *aceA* o *aceB*, respectivamente. Esto se puede hacer reemplazando el promotor tipo silvestre de estos genes por un promotor más débil, o mediante el uso de un elemento que desestabilice el ARN mensajero correspondiente o la proteína. El flujo en el ciclo de Krebs puede ser también incrementado aliviando la represión de ArcA (codificado por el gen *arcA*) que reprime los genes que codifican el ciclo de Krebs. La invención se refiere también al microorganismo, particularmente una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención, es decir, un microorganismo, particularmente una bacteria, que presenta una disponibilidad incrementada del 2-cetoglutarato.

En otra forma de realización el método se realiza con un microorganismo, particularmente una bacteria, en la cual el flujo a la vía de biosíntesis de 5-hidroxi-2-cetopentanoato es estimulado. Esto se puede lograr incrementando la expresión de la 4-oxoglutaril-CoA sintetasa (formadora de AMP, tal como codificada por el gen *prpE*, o formadora de ADP tal como codificada por los genes *sucC* y *sucD*) y/o la aldehído reductasa/alcohol deshidrogenasa. La invención se refiere también al microorganismo, particularmente una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En otra forma de realización de la invención, el microorganismo, particularmente una bacteria, es modificado para presentar un nivel atenuado de conversión de 2-cetoglutarato a compuestos distintos de 1,4-butanodiol. Esto se puede obtener atenuando el nivel de enzimas que consumen 2-cetoglutarato como glutamato deshidrogenasa o glutamato sintasa (codificadas por *gdhA* y *gltB*). Estos genes pueden ser atenuados reemplazando el promotor natural por un promotor más débil o por elementos que desestabilicen el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen se puede lograr también mediante la delección de la secuencia de ADN correspondiente. Asimismo la invención se refiere al microorganismo, en particular una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En otra forma de realización de la invención, el microorganismo, particularmente una bacteria, es modificado para presentar un nivel atenuado de conversión de 4-hidroxibutiraldehído a compuestos distintos de 1,4-butanodiol. Esto se puede obtener atenuando el nivel de enzimas que consumen 4-hidroxibutiraldehído como 4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa (codificada por *aldA*, *aldB*). Estos genes pueden ser atenuados reemplazando el promotor natural por un promotor más débil o por elementos que desestabilicen el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen se puede lograr también mediante la delección de la secuencia de ADN correspondiente. La invención se refiere también al microorganismo, particularmente una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

En otra forma de realización de la invención, el microorganismo, particularmente una bacteria, es modificado con el fin de producir 1,4-butanodiol en condiciones anaeróbicas. Para lograr dicha capacidad, en dicho microorganismo, el sistema de transporte de azúcar de PTS es eliminado para metabolizar azúcar vía un sistema de transporte permeasa/cinasa. Para producir suficiente ATP para crecimiento del microorganismo bajo condiciones anaeróbicas, el oxaloacetato debe ser producido a partir de fosfoenolpiruvato vía actividad fosfoenolpiruvato carboxicinaza codificada por el gen *pckA* en *E. coli*. Esto genera un mol de ATP por mol de oxaloacetato producido. En una manera similar, la conversión de 2-oxoglutarato en 4-oxoglutaril-CoA debe ser lograda por 4-oxoglutaril-CoA sintetasa. La actividad formadora de ADP, tal como codificada por los genes *sucC* y *sucD* en *E. coli*, consume solamente un mol de ATP por mol de 4-oxoglutaril-CoA producida. La vía metabólica descrita para producir 1,4-butanodiol a partir de D-glucosa está particularmente adaptada para condiciones de crecimiento anaeróbicas. El balance de reacción global de dicha vía es: D-glucosa + ADP + Pi → 1,4-butanodiol + formiato + CO₂ + ATP + H₂O. En otra forma de realización de la invención, el microorganismo, particularmente una bacteria, es modificado para presentar un nivel atenuado de conversión de acetil-CoA a compuestos distintos de 1,4-butanodiol; este resultado se puede obtener atenuando el nivel de enzimas que consumen acetil-CoA como acetato cinasa y fosfato acetiltransferasa (codificadas por *ackA* y *pta*). La atenuación de estos genes se puede hacer reemplazando el promotor natural por un promotor de menor fuerza o por elementos que desestabilicen el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen se puede lograr también mediante una delección de la secuencia de ADN correspondiente. Asimismo la invención se refiere al microorganismo, en particular una bacteria, usado en esta forma de realización particular de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de cepas que expresan un gen que codifica ácido 2-ceto descarboxilasa y un gen que codifica hidroxí aldehído reductasa: MG1655

(pME101-kivDII-yqhD-TT07)

1.1 Construcción del plásmido pM-Ptrc01-kivDII-TT07 para la sobreexpresión de kivD de *Lactococcus lactis* que codifica alfa-ceto-isovalerato descarboxilasa

Un gen sintético del *Lactococcus lactis* *kivD* que codifica la alfa-ceto-isovalerato descarboxilasa fue preparado por Geneart (Alemania). El uso de codón y contenido de GC del gen fueron adaptados a *Escherichia coli* de acuerdo con la matriz del proveedor. La expresión del gen sintético fue impulsada por un promotor *Ptrc* constitutivo. Un terminador transcripcional fue agregado hacia 3' del gen. La construcción fue clonada en vectores pM del proveedor y verificada mediante secuenciación. En caso de ser necesario, el gen sintético fue clonado en el vector pME101 (este plásmido se deriva del plásmido pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15 p 4631)) antes de transformar una cepa de *E. coli*.

Ptrc01-kivDII-TT07

sitios de restricción (*Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RV) (SEC ID nº 1): ggatccatgcaagcttatgcgatatc

promotor Ptrc01 (SEC ID nº 2): gagctgttgacaattaatcatccggctcgataatgtgtggaataaggagggtataac

secuencia del gen *kivDII* optimizada para *E. coli* (CAG34226.) (SEC ID nº 3):

atgtataccgtgggtgattatctctggtgctgcatgaactgggcattgaagaaatttcggcgttccgggtgattataatctgcag
tttctggatcagattattagccataaagatagaaatgggtgggtaatgccaatgaactgaatgcaagctatatggcagatgggtatgc
ccgtaccaaaaaagcagcagcatttctgaccaccttgggtgttggaactgagcgcagtaaatggtctggtagctatgcaga
aaatctgccgggtgttgaaatgttgtagcccgaccagcaaatgacgaatgaaggcaaatgtgcatcataccctggccgatgt
gattttaaacatttcatgaaatgcatgaaccgggtaccgagcagctaccctgctgaccgcagaaaaatgcaaccgtgaaattgatc
gtgttctgagcgcactgctgaaagaacgtaaacgggtgtatataatctgccgggtggatgttgagcagcaaaagcagaaaaaccg
agcctgccgctgaaaaaagaaaatagcaccagcaataaccagcaggaatctgaataaaattcaggaatccctgaaaaacg
ccaaaaaacggattgtgattaccggctcatgaaattattagcttggcctggaaaaaacggtaaccagtttattagcaaaacaaactg
ccgattaccacctgaattttgtgaaaaagcagcgttgatgaagcactgccgagcttctgggtatttataatggcacccctgagcgaac
cgaatctgaagaatttgggaaagcgcagatttcattctgatgctgggtgttaactgaccgatagctctaccggtgcatttaccat
catctgaatgaaaaaataatgattagcctgaatattgatgaaggcaaaattttaatgaacgcattcagaatttggatttgaagcctg
attagcagcctgctggatctgagcgaatcgaaataaaggcaaatattgataaaaaacagggaagatttgttccgagcaatgca
ctgctgtctcagcatgctgtgtagcagcgttgaaatctgaccagagcaatgaaaccattgttcagaaacagggcaccagctt
ttgggtgcaagcagcattttctgaaagcaaaagccattttattggtcagccgctgtgggttagcattggttatacctttccggcagca
ctgggtagccagattgcagataaagaagccgctcatctgctgtttattggtgatggttagcctgcagctgaccgttcaggaactgggt
ctggccattcgcgaaaaaataatccgatttcttattatcaataatgatggctataccgtgggaacgtgaaattcatggtccgaatcag
agctataatgatattccgatgtggaattatagcaaaactgccggaatctttgggtgcaaccgaagatcgtgtgtgagcaaaattgtcg
caccgaaaatgaatttgcagcgtgatgaaagaagcacaggcagatccgaatcgtatgtattggattgaactgattctggccaaga
agggtgcaccgaaagtctgaaaaaatgggcaaaactgttcgccgaacagaataaaagctaa

secuencia de terminador T7Te (ref: Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci USA. 24 de abril de 2001;98(9):5019-24.) (SEC ID nº 4): attacgtagaAGATCTcctggtcaccttcgggtgggccttctg

sitios de restricción (*Sma*I, *Bam*HI, *Eco*RI) (SEC ID nº 5):ccccgggatgcggatccatgcgaattc

Para la expresión de un vector de bajo número de copias el plásmido pME101 fue construido como se expone a continuación. El plásmido pCL1920 fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos PME101F y PME101R y el fragmento *Bst*Z171-*Xmn*I del vector pTRC99A que contiene el gen *lacI* y el promotor Ptrc fue insertado en el vector amplificado. El vector resultante fue restringido por *Nco*I y *Bam*HI y el vector que contenía el gen *kivDII* fue restringido por *Afl*III y *Bam*HI. El fragmento que contenía *kivDII* fue después clonado en el vector pME101: El plásmido resultante fue nombrado pME101-*kivDII*-TT07

PME101F (SEC ID nº 6): ccgacagtaa gacgggtaag cctg

PME101R (SEC ID nº 7): agcttagtaa agccctcgct ag

1.2 Construcción de un plásmido pME101-*kivDII*-yqhD-TT07 para la sobreexpresión de *kivD* de *Lactococcus lactis* que codifica alfa-cetoisovalerato descarboxilasa y *yqhD* de *Escherichia coli* que codifica metilglixal reductasa

El vector pME101 y el vector que incluye los genes *kivDII* fueron restringidos por *Sna*BI y *Bgl*II y el fragmento que contiene *yqhD* fue clonado en el vector pME101, el plásmido resultante fue nombrado pME101-*kivDII*-*yqhD*-TT07.

El gen *yqhD* fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de la cepa de *E. coli* MG1655 con los oligonucleótidos *yqhD* F y *yqhD* R:

yqhD F (SEC ID nº 8) **TTACGTA**accagcaaagggagcaagtaatgaacaac

- una región para adición de un sitio de restricción *Sna*BI (letra mayúscula itálica negrita)
- una región (letra minúscula) homóloga a la región *E. coli* MG1655 *yqhD* de 3153357 a 3153385

yqhD R (SEC ID nº 9) **aagatctt**TTAGCGGGCGGCTTCGTATATAC

- una región (letra mayúscula) homóloga a la región *E. coli* MG1655 *yqhD* de 3154540 a 3154518
- una región para adición de un sitio de restricción *Bgl*II (letra minúscula itálica negrita).

El fragmento amplificado por PCR fue cortado con las enzimas de restricción *Sna*BI y *Bgl*II y clonado en los sitios *Sna*BI-*Bgl*II del vector pME101-*kivDII*-TT07 dando por resultado el vector pME101-*kivDII*-*yqhD*-TT07.

5 Ejemplo 2

Construcción de cepas con flujo de vía de etilenglicol incrementado: MG1655 Δ *sdaA* Δ *sdaB* Δ *pykF* *Ptrc18-gpmA* *P**trc18-gpmB* (pME101-*kivDII*-*yqhD*-TT07)**

10 2.1 Construcción de la cepa MG1655 Δ *sdaA* Δ *sdaB*

Para eliminar el gen *sdaA* gene, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permitió la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o un casete de resistencia a kanamicina, mientras eliminaba la mayoría de los genes en cuestión. Para este propósito los siguientes oligonucleótidos fueron usados:

Δ *sdaAF* (SEC ID nº 10)

```
gtcaggagtattatcgtgattagtctattcgacatgtttaaggtggggattggccctcatcttccataaccgtaggccTGTAG
GCTGGAGCTGCTTCG
```

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (1894941-1895020) y el gen *sdaA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>),
- una región (letra mayúscula en negrita) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

Δ *sdaAR* (SEC ID nº 11)

```
GGGCGAGTAAGAAGTATTAGTCACACTGGACTTTGATTGCCAGACCACCGCGT
GAGGTTTCGCGGTATTTGGCGTTTCATGTCCCATATGAATATCCTCCTAAG
```

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (1896336-1896254) del gen *sdaA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>),
- una región (letra mayúscula en negrita) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos Δ *sdaAF* y Δ *sdaAR* fueron usados para amplificar el casete de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4. El producto PCR obtenido fue luego introducido mediante electroporación en la cepa MG 1655 (pKD46). Los transformantes resistentes a kanamicina fueron seleccionados y la inserción del casete de resistencia fue verificada por medio de análisis PCR con los oligonucleótidos *sdaAF* y *sdaAR* definidos a continuación. La cepa retenida fue designada MG1655 Δ *sdaA*::Km. *sdaAF* (SEC ID nº 12): cagcggttcgattcatctgcg (homóloga a la secuencia de 1894341 a 1894360). *sdaAR* (SEC ID nº 13):GACCAATCAGCGGAAGCAAG (homóloga a la secuencia de 1896679 a 1896660).

Los transformantes resistentes a kanamicina fueron después seleccionados y Δ *sdaA*::Km se verificó mediante análisis PCR con los oligonucleótidos previamente definidos *sdaAF* y *sdaAR*. La cepa retenida fue designada MG1655 Δ *sdaA*::Km. Luego Δ *sdaB*::Km se introdujo en la cepa MG1655 Δ *sdaA*::Km mediante transducción. MG1655 Δ *sdaB*::Km se construyó primero usando el mismo método como se describe previamente con los siguientes oligonucleótidos:

Δ *sdaBF* (SEC ID nº 14)

```
cggcattggcccttcagttctcataccgttgaccaatgaaagcgggtaacaattaccgacgatctgattgcccTGTAGC
CTGGAGCTGCTTCG
```

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (2927627-2927705) del gen *sdaB* (secuencia de

referencia en el sitio web <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>),

- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

Δ sdaBR (SEC ID nº 15)

CGCAGGCAACGATCTTCATTGCCAGGCCGCCGCGAGAGGTTTCGCGGTACTTG
GCGTTCATATCTTTACCTGTTTCGTACCATATGAATATCCTCCTTAG

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (2928960-2928881) del gen *sdaB* (secuencia de referencia en el sitio web <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos Δ sdaBF y Δ sdaBR fueron usados para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol a partir del plásmido pKD3. El producto PCR obtenido fue a continuación introducido por medio de electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). Los transformantes resistentes a cloranfenicol fueron después seleccionados y la inserción del casete de resistencia fue verificada mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos sdaBF y sdaBR definidos a continuación. La cepa retenida es designada MG1655 Δ sdaB::Cm. sdaBF (SEC ID nº 16): Gcgttaagtaacggtcac (homóloga a la secuencia de 2927450 a 2927468). sdaBR (SEC ID nº 17): CGATGCCGGAACAGGCTACGGC (homóloga a la secuencia de 2929038 a 2929017). Para transferir Δ sdaB::Cm, se usó el método de transducción con el fago Φ 1. La preparación del lisado de fago de la cepa MG1655 Δ sdaB::Cm se usó para la transducción en la cepa MG1655 Δ sdaA::Km.

Los transformantes resistentes a cloranfenicol fueron después seleccionados y Δ sdaB::Cm se verificó por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos previamente definidos sdaBF y sdaBR. La cepa retenida fue designada MG1655 Δ sdaA::Km Δ sdaB::Cm. Los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol fueron después eliminados. El plásmido pCP20 que lleva FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol fue después introducido en los sitios recombinantes mediante electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, la pérdida de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol fue verificada por medio de un análisis PCR con los mismos oligonucleótidos que se usaron previamente (sdaAF/sdaAR y sdaBF/sdaBR). La cepa retenida fue designada MG1655 Δ sdaA Δ sdaB.

2.2 Construcción de la cepa MG1655 Δ sdaA Δ sdaB Δ pykF6

Para eliminar el gen *pykF*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permitió la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o un casete de resistencia a kanamicina, mientras eliminaba la mayoría de los genes en cuestión. Para este propósito se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Δ pykFF (SEC ID nº 18)

cccatccttctcaacttaagactaagactgtcatgaaaaagaccaaattgttgcacatcggaaccgaaaaccgaaTG TAG
GCTGGAGCTGCTTCG

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (1753689-1753766) de la región *pykF* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

Δ pykFR (SEC ID nº 19)

ggacgtgaacagatgcgggttagtagtgccgctcggtaccagtgcaccagaaaccataactacaacgtcacctttgtgCATA
TGAATATCCTCCTTAG

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (1755129-1755051) de la región *pykF* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos Δ pykFF y Δ pykFR fueron usados para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto PCR obtenido fue luego introducido por medio de electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). Los transformantes resistentes a kanamicina fueron después seleccionados y la inserción del casete de resistencia fue verificada por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos pykFF y pykFR definidos más adelante. La cepa retenida fue designada MG1655 Δ pykF::Km. pykFF (SEC ID nº 20): gcgtaacctttccctggaacg (homóloga a la secuencia de 1753371 a 1753392). pykFR (SEC ID nº 21): gcgttgctggagcaacctgccagc (homóloga a la secuencia de 1755518 a 1755495).

Para transferir Δ pykF::Km, se usó el método de transducción con el fago Pl. La preparación del lisado de fago de la cepa MG1655 Δ pykF::Km se usó para la transducción en la cepa MG1655 Δ sdaA Δ sdaB.

Los transformantes resistentes a kanamicina fueron después seleccionados y Δ pykF::Km se verificó por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos previamente definidos pykFF y pykFR. La cepa retenida fue designada MG1655 Δ sdaA Δ sdaB Δ pykF::Km.

El casete de resistencia a kanamicina fue después eliminado. El plásmido pCP20 portador de FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a kanamicina fue después introducido en los sitios recombinantes mediante electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, la pérdida de los casetes de resistencia a kanamicina fue verificada por medio de un análisis PCR con los mismos oligonucleótidos que se usaron anteriormente (sdaAF/sdaAR, sdaBF/sdaBR y pykFF/pykFR). La cepa retenida fue designada MG1655 Δ sdaA Δ sdaB Δ pykF.

2.3 Construcción de la cepa MG1655 Δ sdaA Δ sdaB Δ pykF Ptrc18-gpmA Ptrc18-gpmB

Para incrementar el nivel de 3-fosfoglicerato, los mutantes Ptrc18-gpmA y Ptrc18-gpmB son construidos. Primero, para reducir la expresión del gen fosfoglicerato mutasa gpmA, el promotor es reemplazado por un promotor *trc* constitutivo modificado con actividad débil. El Ptrc18-gpmA es transferido a la cepa MG1655 Δ sdaA Δ sdaB Δ pykF por medio de transducción.

La cepa MG1655 Ptrc18-gpmA::Km es primero construida usando el mismo método que se describe anteriormente con los siguientes oligonucleótidos:

Ptrc18-gpmAF (SEC ID nº 22)

CCACTGACTTTTCGCCATGACGAACCAGAACCAGCTTAGTTACAGCCATAATAT
ACCTCCTTATTCCACACAGTATACGAGCCGGATGATTAATcGcCAACAGCTCTGT
AGGCTGGAGCTGCTTCG

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (786771-786819) del gen *gpmA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),
- una región (letra mayúscula en cursiva) para la secuencia de promotor *trc* donde las cajas -35 y -10 están subrayadas.

Ptrc18-gpmAR (SEC ID nº 23)

gggtatgcgtaagcattgctgttgcttcgctgcgcgcaatataatgagaattattatcattaaaagatgattgaggagtaagtatCAT
ATGAATATCCTCCTTAG

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (786903-786819) de la región hacia 5' del gen *gpmA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>),

- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos Ptrc18-gpmAF y Ptrc18-gpmAR son usados para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto PCR obtenido es después introducido mediante electroporación en la cepa MG1655 (pKD46), en la cual la enzima recombinasa Red expresada permite la recombinación homóloga. Los transformantes resistentes a kanamicina son después seleccionados, y la inserción del casete de resistencia es verificada por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos gpmAF y gpmAR definidos a continuación. La cepa retenida es designada MG1655 Ptrc18-gpmA::Km. gpmAF (SEC ID nº 24): CCTTCCTCTTTTCAGCAGCTTACC (homóloga a la secuencia de 786673 a 786695). gpmAR (SEC ID nº 25): cgacgatcagcgcaaagtgaagg (homóloga a la secuencia de 787356 a 787333).

Para transferir la modificación Ptrc18-gpmA::Km, se usó transducción con el fago PI. El protocolo seguido es implementado en dos etapas, primero con la preparación del lisado de fago de la cepa MG1655 Ptrc18-gpmA::Km, y segundo la transducción en la cepa MG1655 $\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta pykF$. La construcción de la cepa se describe anteriormente.

1-Preparación del lisado de fago PI

- Inoculación con 100 μ l de un cultivo de toda la noche de la cepa MG1655 Ptrc18-gpmA::Km de 10 ml de LB + Km 50 μ g/ml + glucosa 0,2% + CaCl₂ 5 mM. Incubación durante 30 minutos a 37°C con agitación.-Adición de 100 μ l de lisado de fago PI preparado en la cepa MG1655 (aproximadamente $1 \cdot 10^9$ fago/ml).
- Agitación a 37°C durante 3 horas hasta que todas las células fueron lisadas. Adición de 200 μ l de cloroformo y sometimiento a acción de remolino.
- Centrifugación durante 10 minutos a 4500 g para eliminar los residuos de células.
- Transferencia del sobrenadante a un tubo estéril y adición de 200 μ l de cloroformo.
- Almacenamiento del lisado a 4°C.

2-Transducción

- Centrifugación durante 10 minutos a 1500 g de 5 ml de un cultivo de toda la noche de la cepa MG1655 $\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta pykF$ en medio LB.
- Suspensión del sedimento celular en 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM Tubos de control: 100 μ l células.
- 100 μ l de fagos PI de la cepa MG1655 Ptrc18-gpmA::Km-Tubo de ensayo: 100 μ l de células + 100 μ l de fagos PI de la cepa MG1655 Ptrc18-gpmA::Km.
- Incubación durante 30 minutos a 300C sin agitación. Adición de 100 μ l de citrato de sodio 1 M en cada tubo y sometimiento a acción de remolino.
- Adición de 1 ml de LB.-Incubación durante 1 hora a 37°C con agitación.
- Esparcimiento en cajas de Petri de LB + Km 50 μ g/ml después de centrifugación de los tubos durante 3 minutos a 7000 rpm.
- Incubación a 37°C durante toda la noche.

3-Verificación de la cepa

Los transformantes resistentes a kanamicina son después seleccionados y la modificación del promotor Ptrc18-gpmA::Km es verificada por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos gpmAF y gpmAR anteriormente descritos. La cepa retenida es designada MG1655 $\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta pykF$ Ptrc18-gpmA::Km. Luego el Ptrc18-gpmB es transferido a la cepa MG1655 $\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta pykF$ Ptrc18-gpmA::Km mediante transducción. MG1655 Ptrc18-gpmB::Cm se construye primero usando el mismo método que se describe anteriormente con los siguientes oligonucleótidos:

Ptrc18-gpmBR (SEC ID nº 26)

CGGCGTTCC

CGGCGTTCC

ACTGCGTTTCACCGTGGCGGACTAGGTATACCTGTAACATAATATACCTCCTTA
TTCCACACAgTATACGAGCCGGATGATTAATcGcCAACAGCTCTGTAGGCTGGA
GCTGCTTCG

con

- 5 - una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (4631414-4631366) del gen *gpmB* (secuencia de referencia en el sitio web <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97:6640-6645),
- 10 - una región (letra mayúscula en cursiva) para la secuencia de promotor *trc* donde las cajas -35 y -10 están subrayadas.

Ptcl8-gpmBF (SEC ID nº 27)

15 Gcgggattggtggtcgacagacaacttggtgcataatcagcattactcagaaaattaacgttacagcagtatacggaaaaaagc
CATATGAATATCCTCCTTAG

con

- 20 - una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (4631280-4631365) de la región hacia 5' del gen *gpmB* (secuencia de referencia en el sitio web <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

25 Los oligonucleótidos Ptcl8-gpmBF y Ptcl8-gpmBR se usan para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol a partir del plásmido pKD3. El producto PCR obtenido es después introducido mediante electroporación en la cepa MG1655 (pKD46), en la cual la enzima recombinasa Red expresada, permite la recombinación homóloga. Los transformantes resistentes a cloranfenicol son luego seleccionados y la inserción del casete de resistencia es verificada por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos gpmBF y gpmBR definidos a continuación. La cepa retenida es designada MG1655 Ptcl8-gpmB::Cm gpmBF (SEC ID nº 28): ccttacgaccaatctcatcaataccgg (homóloga a la secuencia de 4630906 a 4630932). gpmBR (SEC ID nº 29): GCAATACCATGACTCACCAGC (homóloga a la secuencia de 4631823 a 4631803).

35 Para transferir la modificación Ptcl8-gpmB::Cm, se usa transducción con el fago Pl. El lisado de fago de la cepa MG1655 Ptcl8-gpmB::Cm se usa para la transducción en la cepa MG1655 $\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta pykF$ Ptcl8-gpmA::Km. Los transformantes resistentes a cloranfenicol son seleccionados luego y Ptcl8-gpmB::Cm se verifica mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos previamente definidos gpmBF y gpmBR. La cepa retenida es designada MG1655 $\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta pykF$ Ptcl8-gpmA::Km Ptcl8-gpmB::Cm. Los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol pueden ser entonces eliminados. El plásmido pCP20 portador de FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol es después introducido en los sitios recombinantes por medio de electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, la pérdida de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol es verificada mediante un análisis PCR con los mismos oligonucleótidos usados anteriormente (gpmAF/gpmAR y gpmBF/gpmBR). La cepa retenida es designada MG1655 $\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta pykF$ Ptcl8-gpmA Ptcl8-gpmB.

2.4 Construcción de la cepa MG1655 $\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta pykF$ Ptcl8-gpmA Ptcl8-gpmB (pME101-kivDII-yqhD-TT07)

50 El plásmido *pME101-kivDII-yqhD-TT07* es después introducido en la cepa MG1655 $\Delta sdaA \Delta sdaB \Delta pykF$ Ptcl8-gpmA Ptcl8-gpmB.

Ejemplo 3

55 **Construcción de cepas con flujo de vía de 1,3-propanodiol incrementado: MG1655 $\Delta metA \Delta pykF \Delta thrLABC::TT07$ -Ptrc-thrA*1 (pME101-kivDII-yqhD-TT07) (pMA-aaoro)**

3.1 Construcción de la cepa MG1655 $\Delta metA$

60 Para eliminar el gen *metA*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o un casete de resistencia a

kanamicina, mientras elimina la mayoría de los genes en cuestión. Para este propósito se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Δ metAF (SEC ID nº 30):

ttcgtgtgccggacgagctacccgccgtcaatttcttgcgtgaagaaaacgtcttgcgtgacaaactctcgtgcgtctTGTAAG
GCTGGAGCTGCTTCG

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (4212310-4212389) de la región *metA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

Δ metAR (SEC ID nº 31):

atccagcgttggattcatgtgccgtagatcgtagcgtgatcgtagacgtaatagtgagccagttggtaaacagtaCATAT
GAATATCCTCCTTAG

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (4213229-4213150) de la región *metA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos Δ metAF y Δ metAR se usaron para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto PCR obtenido fue después introducido mediante electroporación en la cepa MG 1655 (pKD46). Los transformantes resistentes a kanamicina fueron luego seleccionados y la inserción del casete de resistencia fue verificada mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos Δ metAF y Δ metAR definidos a continuación. La cepa retenida fue designada MG1655 Δ metA::Km. *metAF* (SEC ID nº 32): tcaccttcaacatgcaggctcgacattggc (homóloga a la secuencia de 4212203 a 4212232). *metAR* (SEC ID nº 33): ataaaaaaggcaccggaaggtgcctgaggt (homóloga a la secuencia de 4213301 a 4213272).

El casete de resistencia a kanamicina fue después eliminado. El plásmido pCP20 portador de FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a kanamicina fue después introducido en los sitios recombinantes mediante electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, la pérdida del casete de resistencia a kanamicina fue verificada por medio de un análisis PCR con los mismos oligonucleótidos que se usaron anteriormente (*metAF/metAR*). La cepa retenida fue designada MG1655 Δ metA.

3.2 Construcción de la cepa MG1655 Δ metA Δ pykF

Para transferir Δ pykF::Km, se usó transducción con el fago PI. La preparación del lisado de fago de la cepa MG1655 Δ pykF::Km (descrita anteriormente) se usó para la transducción en la cepa MG1655 Δ metA.

Los transformantes resistentes a kanamicina son después seleccionados y Δ pykF::Km se verificó por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos previamente definidos *pykFF* y *pykFR*. La cepa retenida fue designada MG1655 Δ metA Δ pykF::Km.

3.3 Construcción de la cepa MG1655 Δ metA Δ pykF Δ thrLABC::TT07-P_{trc}-*thrA**1

Para incrementar la expresión del alelo resistente a retroalimentación de la aspartocinasa/homoserina deshidrogenasa, *thrA**1, se construyeron los siguientes plásmidos: pSB1 para obtener *thrA**1 y pSB2 para reemplazar el operón *thrLABC* por el alelo *P_{trc}-thrA**1.

El plásmido pSB1 se obtiene del plásmido pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15 p 4631) y contiene el alelo *thrA** de la aspartocinasa/homoserina con resistencia a retroalimentación reducida a treonina (Lee *et al.* 2003 J. Bacteriol. 185, 18 pp. 5442-5451) expresado a partir del promotor *P_{trc}*. Para la construcción de pSB1, *thrA* fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico usando los siguientes oligonucleótidos:

BspHl*thrA* (SEC ID nº 34): TTATCATGAgagtgttgaagttcggcggtacatcagttggc con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (341-371) del gen *thrA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para el sitio de restricción *BspHI* y bases extra,

Smal*thrA* (SEC ID nº 35): TTACCCGGGccgcccgcgagcacatcaaaccgacgc con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (2871-2841) del gen *thrA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para el sitio de restricción *SmaI* y bases extra.

El fragmento amplificado por PCR fue cortado con las enzimas de restricción *BspHI* y *SmaI* y clonado en los sitios *NcoI*/*SmaI* del vector pTRC99A (Stratagene). Para la expresión a partir de un vector de bajo número de copias el plásmido pME101 fue construido como se expone a continuación. El plásmido pCL1920 fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos PME101F y PME101R y el fragmento *BstZ17I*-*XmnI* del vector pTRC99A que contiene el gen *lacI* y el promotor *P_{trc}* fue insertado en el vector amplificado. El vector resultante y el vector que contiene el gen *thrA* fueron restringidos por *Apal* y *SmaI* y el fragmento que contiene *thrA* fue clonado en el vector pME101. Para liberar *ThrA* de inhibición de retroalimentación la mutación *thrAS345F* fue introducida por mutagénesis dirigida en el sitio (Stratagene) usando los oligonucleótidos *ThrA* SF for y *ThrA* SF rev, dando por resultado el vector pSB1.

PME101F (SEC ID nº 36) ccgacagtaagacgggtaagcctg

PME101R (SEC ID nº 37) agcttagtaaagccctcgctag

ThrA SF for (SEC ID nº 38)

CGTATTTCCGTGGTGCTGATTACGCAATTCTCTCCGAGTACTCAATCAGTTTCT
GC

ThrA SF rev (SEC ID nº 39)

GCAGAACTGATTGAGTACTCGGAAGAGAATTGCGTAATCAGCACCCACGGAA
ATACG

Para eliminar el operón *thrLABC* y reemplazarlo por el alelo *P_{trc}-thrA*1*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o un casete de resistencia a kanamicina pero también de ADN adicional, mientras elimina la mayoría de los genes en cuestión. Para este propósito se construyó el siguiente plásmido, pSB2.

El plásmido pSB2 se obtiene del plásmido pUC18 (Norlander *et al.*, Gene 26 (1983), 101-106) y contiene el casete de resistencia a cloranfenicol asociado al alelo *P_{trc}-thrA*1*, clonado entre la región hacia 5' de *thrL* y la región hacia 3' de *thrC*.

Para la construcción de pSB2, la región hacia 5' de *thrL* y la región hacia 3' de *thrC* fueron amplificadas por PCR a partir de ADN genómico usando los siguientes oligonucleótidos:

*HpaI*up*thrL*F (SEC ID nº 40) CGTAGTTAACGAATTCccaactagtgtcatcatacaactaataaacgtgg con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (4638698-4638731) de la región *thrL* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para el sitio de restricción *HpaI* y *EcoRI* y bases extra.

*BstZ17I*up*thrL*R (SEC ID nº 41)

CCCCGGGGGAGGCGCCCCGGGATCCCGGTATACCAGAAAGGCCACCCGAAG
GTGAGCCAGGAaggttaaccagttcagaagctgctatcag

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (87-60) de la región *thrL* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la secuencia de terminador transcripcional T7te (Harrington K.J.,

Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci USA. 24 de abril de 2001;98(9):5019-24.),

- una región (letra mayúscula) para el sitio de clonación múltiple que se compone de los sitios de restricción *Bst*Z17I, *Bam*HI, *Sfo*I y *Sma*I.

BamHIdownthrCF (SEC ID nº 42)

TCCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGGTATACCGGGATCCGCGGGCG
CCTCCCCCGGaatctattcattatctcaatcaggccggg

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (5021-5049) de la región *thrC* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la secuencia de terminador transcripcional T7te (Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci USA. 24 de abril de 2001;98(9):5019-24.),
- una región (letra mayúscula) para el sitio de clonación múltiple que se compone de los sitios de restricción *Bst*Z17I, *Bam*HI, *Sfo*I y *Sma*I.

HpaldownthrCR (SEC ID nº 43) CGTAGTTAACGAATTCgagaatgcccagggaagatctg con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (6054-6031) de la región *thrC* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para el sitio de restricción *Hpa*I y *Eco*RI y bases extra.

Primero, los fragmentos "upthrL" y "downthrC" fueron amplificados por PCR a partir de ADN genómico MG1655 usando oligonucleótidos HpalupthrLF/BstZ17IupthrLR y BamHIdownthrCF/HpaldownthrCR, respectivamente. Segundo, el fragmento "upthrL-downthrC" fue amplificado a partir de fragmentos PCR "upthrL" y "downthrC" (que posee una región superpuesta compuesta por un terminador transcripcional T7Te y el sitio de clonación múltiple compuesto por los sitios de restricción *Bst*Z17I, *Bam*HI, *Sfo*I y *Sma*I) usando oligonucleótidos HpalupthrLF/HpaldownthrCR. El fragmento PCR "upthrL-downthrC" fue cortado con la enzima de restricción *Hpa*I y clonado en los sitios *Eco*RI/*Sfo*I del vector pUC18, dando el plásmido pUC18-DthrLABC::TT07-SMC.

Después, el casete de resistencia a cloranfenicol fue amplificado por PCR a partir del vector pKD3 usando los siguientes oligonucleótidos:

BstZ17ICmF (SEC ID nº 44) GGGGTATACttaggctggagctgcttcg con

- una región (letra minúscula) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),
- una región (letra mayúscula) para el sitio de restricción *Bst*Z17I y bases extra.

BamHICmR (SEC ID nº 45) CGCGGATCCcatatgaatcctccttag con

- una región (letra minúscula) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),
- una región (letra mayúscula) para el sitio de restricción *Bam*HI y bases extra.

El fragmento PCR fue cortado con las enzimas de restricción *Bst*Z17I y *Bam*HI y clonado en los sitios *Bst*Z17I/*Bam*HI del plásmido pUC18- Δ thrLABC::TT07-SMC, dando el plásmido pUC18- Δ thrLABC::TT07-SMC::Cm.

Por ultimo, el alelo *P_{trc}-thrA*1* fue cortado del plásmido pSB1 con las enzimas de restricción *Sfo*I y *Sma*I y clonado en los sitios *Sfo*I/*Sma*I del plásmido pUC18- Δ thrLABC::TT07-SMC::Cm, proporcionando el plásmido pUC18- Δ thrLABC::TT07-*P_{trc}-thrA*1*::Cm o pSB2.

El fragmento Δ thrLABC::TT07-*P_{trc}-thrA*1*::Cm fue obtenido cortando el plásmido pSB2 con la enzima de restricción *Eco*RI y después fue introducido por electroporación en la cepa MG1655 (pKD46), en la cual la enzima recombinasa Red permite la recombinación homóloga. Los transformantes resistentes a cloranfenicol son después seleccionados y la inserción del casete de resistencia es verificada mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos *thrA*1F* y *thrA*1R* definidos a continuación. La cepa retenida es designada MG1655 Δ thrLABC::TT07-*P_{trc}-thrA*1*::Cm. *thrA*1F*

(SEC ID nº 46): cgtgttcggtgttaccacactcg (homóloga a la secuencia (4638276-4638297) de la región *thrL* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>)). *thrA*1R* (SEC ID nº 47) cggaaactgacgcctccgcag (homóloga a la secuencia (6345-6325) de la región *thrC* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>)).

5 Los plásmidos recombinantes fueron verificados mediante secuenciación de ADN.

Para transferir *ΔthrLABC::TT07-Ptrc-thrA*1::Cm*, se usa transducción con el fago Pl. La preparación del lisado de fago de la cepa MG1655 *ΔthrLABC::TT07-Ptrc-thrA*1::Cm* se usa para la transducción en la cepa MG1655 *ΔmetA DpykF::Km*.

10 Los transformantes resistentes a kanamicina y cloranfenicol son seleccionados luego y *ΔthrLABC::TT07-Ptrc-thrA*1::Cm* se verifica mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos previamente definidos *thrA*1F* y *thrA*1R*. La cepa retenida es designada MG1655 *ΔmetA DpykF::Km ΔthrLABC::TT07-Ptrc-thrA*1::Cm*.

15 Los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol pueden ser entonces eliminados. El plásmido pCP20 portador de FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol es después introducido en los sitios recombinantes por medio de electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, la pérdida de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol es verificada mediante un análisis PCR con los mismos oligonucleótidos usados anteriormente (*metAF/metAR*, *pykF/pykFR* y *thrA*1F/thrA*1R*). La cepa retenida es designada MG1655 *ΔmetA DpykF ΔthrLABC::TT07-Ptrc-thrA*1*.

3.4 Construcción del plásmido pMA-aaoro

25 Un gen sintético del gen *Rhodococcus opacus aao* que codifica la aminoácido oxidasa fue preparado por Genearth (Alemania). El uso de codón y contenido de GC del gen fueron adaptados a *Escherichia coli* de acuerdo con la matriz del proveedor. La expresión del gen sintético fue impulsada por un promotor *Ptrc* constitutivo. La construcción fue clonada en el vector pMA del proveedor y verificada mediante secuenciación.

Ptrc01-aaoro:

30 sitios de restricción (*KpnI*, *EcoRI*, *SmaI*) (SEC ID nº 48): ggtaccgaattccccggg

promotor *Ptrc01* y RBS (SEC ID nº 49): gagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtgaaggatccccgggtaaggaggtataa

35 secuencia del gen *aaoro* optimizada para *E. coli* (AY053450.) (SEC ID nº 50):

atggcatttaccgctcgacgtttatgaaaggctgggtgcaaccgggtggtgaggtctggcatatggtgcaatgagcacctgggt
ctggcaccgtctacagcagcaccggcacgtacgtttcagccgctggcagccggtgatctgattggtaaagtgaaggtagccata
gcgtgtgttctgggtggtggtcggcaggtctgtgtagcgcatgttgaaactgcagaaagccgggtataaagtaccgttctggaagc
acgtaccggtccgggtggtcgtgttggaccgacgtggtgtagcgaagaaccgatctgagcgggtgaaaccagaaatgtac
ctttagcgaaggccattttataatgtgtggtgccaccgtattccgcagagccatattaccctggtattgtcgcgaactgggtgtga
aattcagggtttcggcaatcaaaatgccaatacgtttgtgaattatcagagcgataccagcctgagcggtcagagcgttacctatcgt
gcagcaaaagcagatacctttggctatgatgagcgaactgctgaaaaagcaaccgatcagggtgactggatcaggttctgagcc
gtgaagataaagatgactgagcgaattctgagcgatttgggtgatctgtctgatgatggtcgttattctgggtagcagccgtcgtgt
tatgatagcgaaccgggtgccgtctgaattttggcaccgaaaaaaaccgtttgccatgcaggaaagtattctgtagcggtattggt
cgcaattttagctttgatttggctatgatcaggccatgatgatgtttacaccggttgggtggtatggatcgtattattatgcctttcaggat
cgtattggcactgataacatcgtgttcgggtgccgaagtaccagcatgaaaaatgttagcgaagggtgacccgtgaatataccgca
ggcggtagcaaaaaagcattaccgcagattatgccattgtaccattcctccgcatcgtgttgggtcgtctgcagaataatctgcctg
gtgatgttctgaccgcactgaaagcagcaaaaccgagcagcagcggtaaactgggtattgaatatagccgtcgttgggtggaaac
cgaagatcgattttatgggtgcaagcaataccgataaagatattagccagattatgttccgtatgatcattataatagcgatcgtg
gtgtgtgttgcataattatagctcgtgtaaacgccaggaagcatttgaaagcctgaccatcgtcagcgtctggcaaaagcaattgc
agaaggcagcgaattacggcgaaaaatataccggtgatattagcagcagccttagcggtagctggcgtcgtaccaaataatagc
gaaagcgcatgggcaattggcgaggtgaggtgtcgtggtgagccactccggaatatgaaaaactgctggaaccg
gtggataaaatttttccgggtgatcatctgagcaatgcaatgcagtgagcagcatggtgactgaccagcgacgtgatgttga
cccatattcatgaacgtgttgcacaggaagcctaa

40 sitios de restricción (*BglII*, *EcoRV*, *PacI*, *SacI*, *XbaI*, *HindIII*) (SEC ID nº 51): gatctgatattcttaattaagagctctctagaaagctt

3.5 Construcción de la cepa MG1655 $\Delta metA \Delta pykF \Delta thrLABC::TT07-Ptrc-thrA^*1$ (pME101-kivDII-yqhD-TT07) (pMA-aaoro)

Los plásmidos pME101-kivDII-yqhD-TT07 y pMA-aaoro son luego introducidos en la cepa MG1655 $\Delta metA \Delta pykF \Delta thrLABC::TT07-Ptrc-thrA^*1$.

Ejemplo 4

Construcción de cepas con flujo de vía de 1,4-butanodiol incrementado: MG1655 $\Delta sucCD \Delta aceBAK \Delta arcA \Delta gdhA$ (pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-adhE2ca-prpE-TT02) (pME101-kivDII-yqhD-TT07)

4.1 Construcción de la cepa MG1655 $\Delta aceBAK \Delta sucCD$

Para eliminar los genes *aceBAK*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o un casete de resistencia a kanamicina, mientras elimina la mayoría de los genes en cuestión. Para este propósito se usaron los siguientes oligonucleótidos:

$\Delta aceBAKF$ (SEC ID nº 52):

```
ctggctttcacaaggccgtatggcgagcaggagaagcaattcttactgccgaagcggtagaatttctgactgagctggtTGTA
GGCTGGAGCTGCTTCG
```

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (4213531-4213610) de la región *aceB* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

$\Delta aceBAKR$ (SEC ID nº 53):

```
aacatctccacatgcccttcacgtatgcgggtttgtagtgcgcgccagtaacagcgcggaacaggtcggcgtgcatcCATAT
GAATATCCTCCTTAG
```

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (4218298-4218220) de la región *aceK* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos $\Delta aceBAKF$ y $\Delta aceBAKR$ se usan para amplificar el casete de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4. El producto PCR obtenido es luego introducido mediante electroporación en la cepa MG 1655 (pKD46). Los transformantes resistentes a kanamicina son después seleccionados y la inserción del casete de resistencia es verificada por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos *aceBAKF* y *aceBAKR* definidos a continuación. La cepa retenida es designada MG1655 $\Delta metA::Km$. *aceBAKF* (SEC ID nº 54): cgtaagcgattcagcaccttacc (homóloga a la secuencia de 4213251 a 4213274). *aceBAKR* (SEC ID nº 55): aacgcattaccactctgttaatac (homóloga a la secuencia de 4218728 a 4218702).

Para eliminar los genes *sucCD*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o un casete de resistencia a kanamicina, mientras elimina la mayoría de los genes en cuestión. Para este propósito se usaron los siguientes oligonucleótidos:

$\Delta sucCDF$ (SEC ID nº 56):

```
ttttgcccgctatggcttaccagcaccgggtgggttatgcctgtactactccgcggaagcagaagaagccgcttcaaaaCATA
TGAATATCCTCCTTAG
```

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (762268-762347) de la región *sucC* (secuencia de

referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),

- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔsucCDR (SEC ID nº 57):

atatccgccaggctgcgaacgggtttcacgcctgcggcttcagagcagcgaatttctcatccgcagtcctttaccggcTGTA
GGCTGGAGCTGCTTCG

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (764241-764168) de la región *sucD* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos DsucCDF y DsucCDR se usan para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol a partir del plásmido pKD3. El producto PCR obtenido es después introducido mediante electroporación a la cepa MG 1655 (pKD46). Los transformantes resistentes a cloranfenicol son luego seleccionados y la inserción del casete de resistencia es verificada por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos sucCDF y sucCDR definidos más adelante. La cepa retenida es designada MG1655 Δ*sucCD*::Cm. sucCDF (SEC ID nº 58): tcgcaatccgtgggcttcctggtacg (homóloga a la secuencia de 761887 a 761914). sucCDR (SEC ID nº 59): cctctgatgccaaacgaagatgatgagccg (homóloga a la secuencia de 764555 a 764527).

Para transferir Δ*aceBAK*::Km, se usa el método de transducción con el fago Pl. La preparación del lisado de fago de la cepa MG1655 Δ*aceBAK*::Km se usa para la transducción en la cepa MG1655 Δ*sucCD*::Cm.

Los transformantes resistentes a kanamicina y cloranfenicol son seleccionados luego y Δ*aceBAK*::Km se verifica mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos previamente definidos aceBAKF y aceBAKR. La cepa retenida es designada MG1655 Δ*sucCD*::Cm Δ*aceBAK*::Km.

Los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol pueden ser entonces eliminados. El plásmido pCP20 portador de FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol es después introducido en los sitios recombinantes por medio de electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, la pérdida de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol es verificada mediante un análisis PCR con los mismos oligonucleótidos usados anteriormente (aceBAKF/aceBAKR, y sucCDF/sucCDR). La cepa retenida es designada MG1655 Δ*sucCD* Δ*aceBAK*.

4.2 Construcción de la cepa MG1655 Δ*sucCD* Δ*aceBAK* Δ*arcA* Δ*qdhA*

Para eliminar el gen *arcA*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o un casete de resistencia a kanamicina, mientras elimina la mayoría de los genes en cuestión. Para este propósito se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Δ*arcAF* (SEC ID nº 60):

cccgcacattctatcgttgaagacgagttggtaacacgcaacacgttgaaaagtatttcgaagcgggaaggctatGTAGG
CTGGAGCTGCTTCG

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (4638322-4638245) de la región *arcA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

Δ*arcAR* (SEC ID nº 61):

ccagatcaccgcagaagcgataaccttcaccgtgaatggtggcgatgattccggcgtagattcgaaatgCATA
TGAATATCCTCCTTAG

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (4637621-4637699) de la región *arcA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

Los oligonucleótidos DarcAF y DarcAR se usan para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto PCR obtenido es después introducido mediante electroporación a la cepa MG 1655 (pKD46). Los transformantes resistentes a kanamicina son luego seleccionados y la inserción del casete de resistencia es verificada por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos arcAF y arcAR definidos más adelante. La cepa retenida es designada MG1655 Δ arcA::Km. arcAF (SEC ID nº 62): cgacaattggattcaccacg (homóloga a la secuencia de 4638746 a 4638727). arcAR (SEC ID nº 63): gcggattgaaaggttggtgc (homóloga a la secuencia de 4637308 a 4637328).

Para transferir Δ arcA::Km, se usa transducción con el fago PI. El lisado de fago de la cepa MG1655 DarcA::Km se usa para la transducción en la cepa MG1655 Δ sucCD Δ aceBAK.

Los transformantes resistentes a kanamicina son seleccionados a continuación y Δ arcA::Km se verifica mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos previamente definidos arcAF and arcAR. La cepa retenida es designada MG1655 Δ sucCD Δ aceBAK Δ arcA::Km.

Para eliminar el gen *gdhA*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Los oligonucleótidos Δ gdhAF y Δ gdhAR se usan para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol a partir del plásmido pKD3.

Δ gdhAF (SEC ID nº 64): taaacaacataagcacaatcgattataatataagggttttatctatg**TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG** con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (1840348 to 1840397) hacia 5' del gen *gdhA* (<http://ecogene.org/bblast.php>)
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

Δ gdhAR (SEC ID nº 65): taagcgtagcgccatcagcgattacaacttaacacacctgcgcag**CATATGAATATCCTCCTTAG** con:

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (1841767 a 1841718) al extremo y la región hacia 3' del gen *gdhA* (<http://ecogene.org/bblast.php>)
- una región (letra mayúscula negrita) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

El producto PCR obtenido es después introducido mediante electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). Los transformantes resistentes a cloranfenicol son luego seleccionados y la inserción del casete de resistencia es verificada por medio de un análisis PCR con los oligonucleótidos Ptrc-gdhAverF y *gdhA* R.

Ptrc-gdhAverF(SEC ID nº 66): CCTTAACGTTATTGTCTCTGC

- una región homóloga a la secuencia (1840168-1840188) de la región hacia 5' del gen *gdhA* (<http://ecogene.org/bblast.php>)

gdhA R(SEC ID nº 67): GGAGGAAGCCCCAGAGCAGG

- una región homóloga a la secuencia (1842274-1842293) de la región hacia 3' del gen *gdhA* (<http://ecogene.org/bblast.php>).

La cepa obtenida fue nombrada MG1655 Δ gdhA::Cm.

Para transferir Δ gdhA::Cm, se usa transducción con el fago PI. El lisado de fago de la cepa MG1655 Δ gdhA::Cm se usa para la transducción en la cepa MG1655 Δ sucCD Δ aceBAK Δ arcA::Km.

Los transformantes resistentes a kanamicina y cloranfenicol son seleccionados luego y Δ gdhA::Cm se verifica mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos previamente definidos Ptrc-gdhAverF y *gdhA* R. La cepa retenida es designada MG1655 Δ sucCD Δ aceBAK Δ arcA::Km Δ gdhA::Cm.

Los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol pueden ser entonces eliminados. El plásmido pCP20 portador de FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol es después introducido en los sitios recombinantes por medio de electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, la pérdida de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol es verificada mediante un análisis PCR con los mismos oligonucleótidos usados anteriormente (aceBAKF/aceBAKR, sucCDF/sucCDR, arcAF/arcAR, y gdhAverF/gdhA R). La cepa retenida es designada MG1655 Δ sucCD Δ aceBAK Δ arcA Δ gdhA.

4.3 Construcción de un plásmido para sobreexpresión del acetaldehído-CoA/alcohol deshidrogenasa bifuncional adhE2 de *Clostridium acetobutylicum* y el gen propionil-CoA sintetasa prpE de *Escherichia coli*: pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-adhE2ca-prpE-TT02

El gen *adhE2* de *Clostridium acetobutylicum* que codifica la acetaldehído-CoA/alcohol deshidrogenasa bifuncional fue clonado en el plásmido pUC19. El gen *prpE* que codifica la propionil-CoA sintetasa fue clonado hacia 5' *adhE2*.

El gen *adhE2* fue amplificado por PCR a partir del megaplásmido pSol1 de la cepa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 (posición 33722 a 36298) con los oligonucleótidos adhE2Ca F y adhE2Ca R.

adhE2Ca F (SEC ID nº 68):

ggtagcgggatccgggcccagctgttgacaattaatcatccggctcgataatgtgtggaattgtgagcgggataacaattTACG
TAtaaggaggtatattATGAAAGTTACAAATCAAAAAGAAC

con

- región (letra minúscula negrita) para la adición del sitio de restricción *KpnI*, *BamHI*, *Apal*.
- región (letra minúscula subrayada) para la adición del promotor *Ptrc01*
- región (letra minúscula en cursiva) para la adición de una secuencia de operador *OP01*
- región (letra mayúscula negrita) para la adición del sitio de restricción *SnaBI*
- región (letra minúscula) para la adición de la secuencia *RBS01*
- región (letra mayúscula subrayada) homóloga a la región *C.acetobutylicum adhE2* de 33722 a 33752

adhE2Ca R (SEC ID nº 69):

GAGCTCAAGCTTaaacagataaaacgaaaggcccagctcttctgactgagcctttcgttttatttgatgcctagggcta
gctctagattaaTTAAATGATTTTATATAGATATCCTTAAGTTCAC.

con

- región (letra mayúscula) para la adición del sitio de restricción *HindIII*, *SacI*.
- región (letra minúscula subrayada negrita) para la adición del terminador *TT02*
- región (letra en cursiva) para la adición del sitio de restricción *PacI*, *XbaI*, *NheI*, *AvrII*
- región (letra mayúscula subrayada) homóloga a la región *C.acetobutylicum adhE2* de 36264 a 36298).

Este fragmento PCR fue digerido con *BamHI* y *HindIII* y clonado en el vector pUC19 digerido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido obtenido fue nombrado pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-adhE2ca-TT02.

Para amplificar el gen *prpE*, una PCR se lleva a cabo usando ADN cromosómico de *E. coli* como plantilla y los iniciadores *prpE* F y *prpE* R.

prep F (SEC ID nº 70): **tctagaggatcc**aagttcaacaggagagcattatg

- una región (negrita subrayada) para la adición de los sitios de restricción *XbaI* y *BamHI*
- una región homóloga (letra minúscula) a la región de 351910 a 351932 (<http://ecogene.org/bblast.php>)

prep R (SEC ID nº 71): **ggatccgctagccctaggttacgta**ctactcttccatcgctggc

- una región (negrita subrayada) para la adición de los sitios de restricción *BamHI*, *NheI*, *AvrII*, *SnaBI*
- una región (letra minúscula) homóloga a la región de 353816 a 353797 (<http://ecogene.org/bblast.php>)

Este fragmento PCR fue digerido con *XbaI* y *NheI* y clonado en el vector pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-adhE2ca-TT02 digerido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido obtenido fue nombrado pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-adhE2ca-prpE-TT02.

4.4 Construcción de la cepa MG1655 Δ sucCD Δ aceBAK Δ arcA Δ gdhA (pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-adhE2ca-prpE-

TT02) (pME101-kivDII-yqhD-TT07)

Los plásmidos *pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-adhE2ca-prpE-TT02* y *pME101-kivDII-yqhD-TT07* son después introducidos en la cepa MG1655 Δ sucCD Δ aceBAK Δ arcA Δ gdhA.

Ejemplo 5

Fermentación de cepas que producen etilenglicol en matraces Erlenmeyer

Los rendimientos de las cepas fueron evaluados en cultivos en matraz Erlenmeyer con deflectores de 500 ml usando medio M9 modificado (Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:120-128) que fue complementado con 10 g/l MOPS y 10 g/l glucosa y ajustado a pH 6,8. En caso de ser necesario se añadió espectinomicina a una concentración de 50 mg/l y/o cloranfenicol se añadió en caso de ser necesario a una concentración de 30 mg/l. Un precultivo de 24h se usó para inocular un cultivo de 50 ml a un OD600 nm de aproximadamente 0,3. Los cultivos fueron mantenidos en un agitador a 37°C y 200 rpm hasta que la glucosa en el medio de cultivo se agotó. Al final del cultivo, la glucosa y productos principales fueron analizados mediante HPLC usando una columna Biorad HPX 97H para la separación y un refractómetro para la detección. La producción de etilenglicol fue confirmada por medio de cromatografía de gases /espectrometría de masa (GC/MS) con un cromatógrafo de gases Hewlett Packard serie 6890 acoplado a un detector selectivo de masa Hewlett Packard serie 5973 (EI) y una columna HP-INNOWax (25 m de longitud, 0,20 mm i.d., grosor de película 0,20 micras). El tiempo de retención y espectro de masa de etilenglicol generado fueron comparados con aquel de etilenglicol auténtico.

La comparación de los rendimientos entre la cepa de producción y la cepa de referencia se da en el cuadro a continuación (ver a continuación para la construcción de la cepa de producción).

Ref del cultivo	Genotipo de la cepa	[etilenglicol] (mM)
FbDI_0180	MG1655 DpykF	nd
FbDI_0184	MG1655 DpykF (pME101-kivDII-yqhD-yeaB-TT07) (pCC1BAC-serA)	0,63

nd: no detectado.

Ejemplo 6

Construcción de una cepa con flujo de vía de etilenglicol incrementado: MG1655 Δ pykF (pME101-kivDII-yqhD-yeaB-TT07) (pCC1BAC-serA)

6.1 Construcción de un plásmido para la sobreexpresión del ácido hidroxil ceto descarboxilasa kivD de *Lactococcus lactis*, los genes hidroxil aldehído reductasa yqhD y fosfohidroxil piruvato fosfatasa yeaB de *Escherichia coli*: plásmido pME101-kivDII-yqhD-yeaB-TT07

El fragmento que contiene yeaB fue restringido por *Xba*I y *Bgl*II y clonado en el vector pME101-kivDII-yqhD restringido por las mismas enzimas de restricción, el plásmido resultante fue llamado pME101-kivDII-yqhD-yeaB-TT07.

El gen yeaB fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de la cepa MG1655 de *E. coli* con los oligonucleótidos yeaB F y yeaB R:

yeaB F (SEC ID nº 72)

AGCTGTATACTAGAATTCATAGATCT~~taaggaggtatatt~~ATGGAATACCGTAGCCTGAC
GC

- una región (letra mayúscula en cursiva negrita) para adición de los sitios de restricción *Bst*Z17I, *Eco*RI y *Bgl*II.
- una región (letra minúscula subrayada) para adición de un sitio de unión de ribosoma.
- una región (letra mayúscula) homóloga a la región MG1655 yeaB de *E. coli* de 1894195 a 1894215 (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),

yeaB R (SEC ID nº 73)

GCTTATAAGCCAGCTGGCTCTAGATAGCAGAAAGGCCCAACCGAAGGTGAGCCA
GGAGTATACATGAAGCATTTCCGTTAATTAACGGAGCTCATCCTAGGTCAGGGTTT
CACACCAATTTGCAGCGCC

- una región (letra mayúscula negrita) homóloga a la región MG1655 *yeaB* de *E. coli* de 1894772 a 1894745 (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula subrayada) homóloga a la secuencia de terminador T7Te (ref: Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci USA. 24 de abril de 2001;98(9):5019-24.):
- una región (letra mayúscula en cursiva) para adición de los sitios de restricción *PsiI*, *PvuII*, *XbaI*, *BstZ17I*, *XmnI*, *PacI*, *SacI* y *AvrII*.

El fragmento amplificado por PCR fue cortado con las enzimas de restricción *XbaI* y *BglII* y clonado en los sitios *XbaI*-*BglII* del vector pME101-*kivDII-yqhD*-TT07 proporcionando el vector pME101-*kivDII-yqhD-yeaB*-TT07.

6.2 Construcción de un plásmido para sobreexpresión del fosfoglicerato deshidrogenasa *serA* de *Escherichia coli*: plásmido pCC1BAC-*serA*

Para incrementar la expresión del gen *serA*, el gen fue expresado a partir del vector de control de copia pCC1BAC (Epicentre) usando su propio promotor.

Para este propósito, el gen *serA* fue amplificado a partir del genoma de *E. coli* usando los oligonucleótidos *serA* F y *serA* R. El producto PCR fue restringido usando las enzimas *XbaI* y *SmaI* y clonado en el vector pUC18 (Stratagene) restringido por las mismas enzimas de restricción. El vector resultante fue nombrado pUC18-*serA*.

serA F (SEC ID nº 74): ctag**TCTAG**ATTAGTACAGCAGACGGGCGCG con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (3055199-3055220) del gen *serA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (negrita) que contiene el sitio *XbaI*

serA R (SEC ID nº 75): tcc**CCCGGGAAGCTT**CCGTCAGGGCGTGGTGACCG con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (3056880-3056861) de la región del gen *serA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (negrita) que contiene los sitios *SmaI* y *HindIII*.

Para transferir el gen *serA* en el vector de control de copia pCC1BAC, el vector pUC18-*serA* fue restringido con la enzima *HindIII* y clonado en *HindIII* pCC1BAC listo para clonación (Epicentre).

La construcción resultante fue verificada y llamada pCC1BAC-*serA*.

6.3 Construcción de la cepa MG1655 Δ pykF (pME101-*kivDII-yqhD-yeaB*-TT07) (pCC1BAC-*serA*)

La construcción de la cepa MG1655 Δ pykF fue detallada anteriormente (parte 2.2).

Los plásmidos pCC1BAC-*serA* y pME101-*kivDII-yqhD-yeaB*-TT07 fueron después introducidos en la cepa MG1655 Δ pykF.

Ejemplo 7

Demostración de la actividad ácido hidroxi ceto descarboxilasa codificada por el gen *kivD* de *Lactococcus lactis*

7.1 Construcción de la cepa para caracterización de KivD: BL21 (pPAL7-*kivDII*)

Para caracterizar la proteína KivD, el gen correspondiente fue precisado a partir del vector de expresión pPAL7 (Bio-rad).

Para este propósito, el gen *kivD* fue amplificado a partir del genoma de *Lactococcus lactis* usando los oligonucleótidos pPAL7-*kivDII* F y pPAL7-*kivDII* R. El producto PCR fue restringido usando las enzimas *HindIII* y *EcoRI* y clonado en el vector pPAL7 restringido por las mismas enzimas de restricción. El vector resultante fue nombrado pPAL7-*kivDII*.

pPAL7-*kivDII* F (SEC ID nº 76): ccc**AAGCTT**tg**ACTTCTATGTATACCGTGGGTGATTATC** con

- una región (en cursiva) homóloga a la secuencia del gen sintético del gen *Lactococcus lactis* *kivD*,

- una región (negrita) que contiene los nucleótidos necesarios para generar proteína libre de etiqueta que contiene una extensión de aminoácido N-terminal corta para favorecer la purificación.

- una región (subrayada) que contiene el sitio de restricción *HindIII*.

pPAL7-kivDII R (SEC ID nº 77): gGAATTCCTTAGCTTTTATTCTGTTCGGCGAACAG con

- una región (en cursiva) homóloga a la secuencia del gen sintético del gen *Lactococcus lactis kivD*,
- una región (subrayada) que contiene el sitio de restricción *EcoRI*.

El plásmido pPAL7-kivDII fue después introducido en las células competentes de la cepa BL21 (DE3) (Invitrogen).

7.2 Sobreproducción de la proteína KivD

La sobreproducción de la proteína KivD se realizó en un matraz Erlenmeyer de 2 l, usando caldo LB (Bertani, 1951, J. Bacteriol. 62:293-300) que fue complementado con 2,5 g/l glucosa y 100 mg/l de ampicilina. Un precultivo de toda la noche se usó para inocular un cultivo de 500 ml a un OD_{600nm} de aproximadamente 0,15. Este precultivo se llevó a cabo en un matraz Erlenmeyer de 500 ml lleno con 50 ml de caldo LB que fue complementado con 2,5 g/l glucosa y 100 mg/l de ampicilina. El cultivo se mantuvo primero en un agitador a 37°C y 200 rpm hasta que OD_{600 nm} fue aproximadamente 0,5 y después el cultivo fue movido en un segundo agitador a 25°C y 200 rpm hasta que OD_{600 nm} fue 0,6-0,8 (aproximadamente una hora), antes de inducción con IPTG 500 µM. El cultivo se mantuvo a 25°C y 200 rpm hasta que OD_{600 nm} fue aproximadamente 4, y después fue detenido. Las células fueron centrifugadas a 7000 rpm, 5 minutos a 4°C, y luego almacenadas a -20°C.

7.3 Purificación de la proteína KivD

7.3.1 Etapa 1: Preparación de extractos libres de células

Aproximadamente 188 mg de biomasa de *E. coli* fueron suspendidos en 30 ml de fosfato de potasio 100 mM pH 7,6, y una mezcla de inhibidor de proteasa. La suspensión de células (15 ml por tubo cónico) fue sonicada en hielo (Bandelin sonoplus, 70 W) en un tubo cónico de 50 ml durante 8 ciclos de 30 seg con intervalos de 30 seg. Después de la sonicación, las células fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con MgCl₂ 5 mM y 1 UI/ml de DNaseI. Los residuos de las células fueron retirados por medio de centrifugación a 12000g durante 30 minutos a 4°C.

7.3.2 Etapa 2: Purificación por afinidad

La proteína fue purificada a partir de extracto de células crudo por afinidad en una columna Profinity (BIORAD, Bio-Scale Mini Profinity cartucho exacto 5 ml) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El extracto crudo fue cargado en un cartucho exacto Profinity de 5 ml equilibrado con fosfato de potasio 100 mM pH 7,6. La columna fue lavada con 10 volúmenes de columna del mismo regulador de pH e incubada toda la noche con fosfato de potasio 100 mM pH 7,6, fluoruro 100 mM a 4°C. La proteína fue eluida de la columna con 2 volúmenes de columna de fosfato de potasio 100 mM pH 7,6. La etiqueta permaneció fuertemente unida a la resina y la proteína purificada fue liberada. Las fracciones que contenían la proteína fueron depositadas y dializadas contra fosfato de potasio 100 mM, NaCl 150 mM y 10% glicerol pH 8.

La concentración de proteína fue medida usando el ensayo de proteína Bradford.

7.4 Ensayo de ácido hidroxilo ceto descarboxilasa

7.4.1 Síntesis química de ácido 5-hidroxi-2-cetopentanoico

La síntesis química de ácido 5-hidroxi-2-cetopentanoico ha sido descrita en la publicación:

Friedhelm Korte, Karl Heinz Büchel, α -Hydroxyalkyliden-lacton-Umlagerung, X. α -Hydroxyalkyliden-lacton-Umlagerung in wäßriger Salzsäure Chemische Berichte, Volumen 92 Ejemplar 4, páginas 877-883 (1959).

7.4.2 Síntesis química de ácido 4-hidroxi-2-cetobutírico

La síntesis química de ácido 4-hidroxi-2-cetobutírico ha sido descrita en la publicación:

R S Lane ;EE Dekker ; (1969). 2-keto-4-hydroxybutyrate. Synthesis, chemical properties, and as a substrate for lactate dehydrogenase of rabbit muscle Biochemistry., 8 (7), 2958-2966.

7.4.3 Ensayo de ácido hidroxi ceto descarboxilasa

La descarboxilación de ácidos hidroxi ceto fue medida a 30°C usando un ensayo enzimático acoplado. El ensayo de actividad ácido hidroxi ceto descarboxilasa se llevó a cabo con regulador de pH de fosfato de potasio 50 mM pH 6, NADH 0,2 mM, MgSO₄ 1 mM, difosfato de tiamina 0,5 mM, 72 unidades/ml alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*, ácido hidroxi ceto 10 mM neutralizado (ácido hidroxipirúvico o ácido 4-hidroxi-2-cetobutírico o ácido 5-hidroxi-2-cetopentanoico) y aproximadamente 40 µg de proteína purificada en un volumen total de 1 ml. El consumo de NADH fue monitorizado a 340 nm en un espectrofotómetro. La actividad detectada en ensayo de control, que carece del sustrato, fue sustraída de la actividad detectada en el ensayo con sustrato. Una unidad de actividad ácido hidroxi ceto descarboxilasa es la cantidad de enzima requerida para catalizar la descarboxilación de 1 µmol de ácido hidroxi ceto por minuto a 30°C. (Epsilon 340 nm = 6290 M⁻¹ cm⁻¹).

7.5 Actividad de enzima purificada

	Actividad de enzima purificada (mUI/mg)
Ensayo de hidroxipiruvato descarboxilasa	79
Ensayo de 4-hidroxi-2-cetobutirato descarboxilasa	70
Ensayo de 5-hidroxi-2-cetopentanoato descarboxilasa	63

Ejemplo 8

Demostración de la actividad hidroxi aldehído reductasa codificada por el gen *yqhD* de *Escherichia coli*

8.1 Construcción de una cepa para caracterización de YqhD: MG1655 ΔpykF::Km (pTRC99A-yqhD)

8.1.1 Construcción de la cepa MG1655 ΔyqhD::Km

Para eliminar el gen *yqhD*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o kanamicina, mientras elimina la mayoría de los genes en cuestión. Para este propósito se usaron los siguientes oligonucleótidos:

ΔyqhDF (SEC ID nº 78)

atgaacaactttaatctgcacaccccaacccgcattctgtttgtaaaaggcgcaatcgctggttacgcgaacaaattccgtgtaggc
tggagctgcttcg

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (3153377 a 3153456) de la región *yqhD* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔyqhDR (SEC ID nº 79)

ttatcgggcggttcgtatatacggcggtgacatccaacgtaatgtcatgattttgccagttgggtcatgccgtgctccatatga
atatcctccttag

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (3154540 a 3154460) de la región *yqhD* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos ΔyqhDF y ΔyqhDR se usan para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto PCR obtenido es después introducido por medio de electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). Los transformantes resistentes a kanamicina son luego seleccionados y la inserción del casete de resistencia es verificada mediante un análisis PCR con los oligonucleótidos yqhDF y yqhDR definidos más adelante. La cepa retenida es designada MG1655 ΔyqhD::Km. yqhDF (SEC ID nº 80): ggcgtctcgccatacaacaacgcacatcgggc (homóloga a la secuencia de 3153068 a 3153100). yqhDR (SEC ID nº 81): gggctttgccgacacctcttctgttcttg (homóloga a la secuencia de 3154825 a 3154797).

8.1.2 Construcción del plásmido pTRC99A-yqhD

Para caracterizar la proteína YqhD, el gen correspondiente fue expresado a partir del vector pTRC99A (Amersham).

- 5 Para este propósito, el gen *yqhD* fue amplificado a partir del genoma de *E. coli* usando los oligonucleótidos yqhD F pTRC99A F y yqhD R pTRC99A R. El producto PCR fue restringido usando las enzimas *HindIII* y *BspHI* y clonado en el vector pTRC99A restringido por las enzimas de restricción *NcoI*-*HindIII*. El vector resultante fue nombrado pTRC99A-yqhD.

10 yqhD F pTRC99A F (SEC ID nº 82): cgatgcacg**tc**atgaacaactttaatctgcacaccccaacccg, con:

- una región (subrayada) homóloga a la secuencia (3153377 a 3153408) del gen *yqhD* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),

15 - un sitio de restricción *BspHI* (negrita)

yqhD R pTRC99A R (SEC ID nº 83): ggcgtaaa**aagc**ttagcggcgccgcttcgtatatacggcggctgacatccaacgtaatgctgattttcg con:

- 20 - una región (subrayada) homóloga a la secuencia (3154540 a 3154483) del gen *yqhD* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- un sitio de restricción *HindIII* (negrita).

El plásmido pTRC99A-yqhD fue después introducido en la cepa MG1655 Δ yqhD::Km.

25

8.2 Sobreproducción de la proteína YqhD

La proteína YqhD fue sobreproducida a 37°C bajo condiciones aeróbicas en matraces Erlenmeyer con deflectores de 2 l con 500 ml de medio LB con 2,5 g/l glucosa y 50 mg/l de ampicilina y 50 mg/l de kanamicina. Los matraces fueron agitados a 200 rpm en un agitador orbital. Cuando la densidad óptica medida a 550 nm alcanzó 0,5 unidades, los matraces fueron incubados a 25°C. Cuando la densidad óptica alcanzó 1,2 unidades, la producción de proteínas YqhD fue inducida añadiendo IPTG a una concentración final de 500 μ M. La biomasa fue cosechada mediante centrifugación cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica superior a 3,5 unidades. El sobrenadante fue desechado y el sedimento fue almacenado a -20°C antes de usar.

35

8.3 Purificación de la proteína YqhD

8.3.1 Etapa 1: Preparación de extractos libres de células

40 400 mg de biomasa de *E. coli* fueron suspendidos en 70 ml de Hepes 50 mM pH 7,5, y una mezcla de inhibidor de proteasa. Las células fueron sonificadas en hielo (Branson sonifier, 70W) en un Rosett cell RZ3 durante ocho ciclos de 30 seg con intervalos de 30 seg. Después de la sonicación, las células fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con MgCl₂ 1mM y 1UI/ml de DNaseI. Los residuos de células fueron retirados mediante centrifugación a 12000g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se mantuvo como el extracto crudo.

45

8.3.2 Etapa 2: Precipitación de sulfato de amonio

El extracto crudo fue precipitado a una concentración de 50% sulfato de amonio: sulfato de amonio sólido (300 g/l) se añadió al extracto crudo en hielo. Después de 15 minutos de incubación a 4°C, la mezcla fue centrifugada a 12000g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el precipitado fue disuelto en 50 ml de Hepes 50 mM pH 7,5, sulfato de amonio 1 M.

50

8.3.3 Etapa 3: Cromatografía hidrófoba

55 Usando un purificador Akta (GE Healthcare), el extracto de proteína de la etapa anterior fue cargado en una columna HiTrap PhenylHP de 5 ml (GE Healthcare) equilibrada con el mismo regulador de pH. La columna fue lavada con 10 volúmenes de columna del mismo regulador de pH. Las proteínas fueron eluidas con dos gradientes de etapas, un gradiente de 10 volúmenes de columna de sulfato de amonio de 1 M a 0,5 M y un gradiente de 20 volúmenes de columna de sulfato de amonio de 0,5 M a 0 M. Después de la elución, la columna fue lavada con 10 volúmenes de columna de Hepes 50 mM pH 7,5. El índice de flujo de la columna fue 2,5 ml/min y se recolectaron fracciones de 2,5 ml. Las fracciones que contienen la proteína fueron depositadas, dializadas en Hepes 50 mM pH 7,5 y concentradas a una concentración de 1,14 μ g/ μ l.

60

8.4 Ensayos de hidroxialdehído reductasa

8.4.1 Síntesis química de 4-hidroxibutiraldehído

5 La síntesis química de 4-hidroxibutiraldehído ha sido descrita en la publicación:

N° 158 Transposition des dihydro-2,5 furannes en di hydro-2,3 furannes.-Application à la préparation de l'hydroxy-4 butanal ; par R. PAUL, M. FLUCHAIRE et G. GOLLARDEAU.

10 Bulletin de la Société Chimique de France, 668-671, 1950.

8.4.2 Ensayo de actividad glicolaldehído y 4-hidroxibutiraldehído reductasa

15 La actividad glicolaldehído y 4-hidroxibutiraldehído reductasa fue sometida a ensayo midiendo el índice inicial de oxidación de NADPH con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm y a una temperatura constante de 30°C. La mezcla de reacción usando glicolaldehído o 4-hidroxibutiraldehído como sustrato se llevó a cabo en Hepes 20 mM pH 7,5, sulfato de cinc 0,1 mM, NADPH 0,2 mM, 2 µg de enzima purificada en un volumen final de 1 ml. La mezcla de reacción fue incubada durante 5 min a 30°C y luego la reacción fue iniciada mediante la adición del sustrato (glicolaldehído o 4-hidroxibutiraldehído) a una concentración final de 10 mM. Un ensayo de control (blanco), que carecía del sustrato, se realizó en paralelo y el valor medido para el control fue sustraído del valor medido para el ensayo para tomar en cuenta oxidación no específica de NADPH. (Epsilon 340 nm = 6290 M⁻¹ cm⁻¹).

25 Una unidad de actividad de enzima fue definida como la cantidad de enzima que consumió 1 µmol de sustrato por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad de enzima específica fue expresada como unidades por mg de proteína.

8.4.3 Ensayo de actividad 3-hidroxipropionaldehído reductasa

30 La actividad de YqhD hacia el sustrato 3-hidroxipropionaldehído

(3-HPA) ha sido descrita en la publicación:

35 Hongmei Li ;Jia Chen ;Hao Li ;Yinghua Li ;Ying Li ; (2008).Enhanced activity of yqhD oxidoreductase in synthesis of 1,3-propanediol by error-prone PCR Prog Nat Sci., 18 (12), 1519-1524.

Estos autores han usado cloruro de cinc 5mM, EDTA 1mM y Beta-mercaptoetanol 1mM para sus ensayos de 3-hidroxipropionaldehído reductasa.

8.5 Actividad de enzima purificada

40

	Actividad de enzima purificada (mUI/mg)
Ensayo de actividad glicolaldehído reductasa	9840
Ensayo de actividad 3-hidroxipropionaldehído reductasa	7918
Ensayo de actividad 4-hidroxibutiraldehído reductasa	1443

Ejemplo 9

Demstración de la actividad L-serina transaminasa codificada por el gen serC de *Escherichia coli*

45

9.1 Construcción de la cepa para caracterización de SerC: BL21 (pPAL7-serC)

Para caracterizar la proteína SerC, el gen correspondiente fue expresado a partir del vector de expresión pPAL7 (Bio-rad).

50

Parece propósito, el gen serC fue amplificado a partir del genoma de *E. coli* usando los oligonucleótidos pPAL7-serC F y pPAL7-serC R. El producto PCR fue restringido usando las enzimas *Hind*III y *Eco*RI y clonado en el vector pPAL7 restringido por las mismas enzimas de restricción. El vector resultante fue nombrado pPAL7-serC.

55 pPAL7-serC F (SEC ID nº 84): cccAAGCTTtgATGGCTCAAATCTTCAATTTTAGTTCTGG con

- una región (negrita) homóloga a la secuencia (956876-956904) del gen serC (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),

- una región (subrayada) que contiene el sitio de restricción *Hind*III

pPAL7-serC R (SEC ID nº 85): gGAATTCTTAACCGTGACGGCGTTCGAACTCAACC con

- una región (negrita) homóloga a la secuencia (957964-957937) de la región del gen *serC* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),

- una región (subrayada) que contiene el sitio de restricción *EcoRI*.

El plásmido pPAL7-*serC* fue después introducido en células BL21 (DE3) competentes (Invitrogen).

9.2 Sobreproducción de la proteína SerC

La sobreproducción de la proteína SerC se hizo aplicando el mismo protocolo que el ejemplo 7.2

9.3 Purificación de la proteína SerC

9.3.1 Etapa1: Preparación de extractos libres de células

Aproximadamente 280 mg de biomasa de *E. coli* fueron suspendidos en 45 ml de fosfato de potasio 100 mM pH 7,6, y una mezcla de inhibidor de proteasa. La suspensión de células (15 ml por tubo cónico) fue sonicada en hielo (Bandelin sonoplus, 70 W) en un tubo cónico de 50 ml durante 8 ciclos de 30 seg con intervalos de 30 seg. Después de la sonicación, las células fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con MgCl₂ 5 mM y 1UI/ml de DNaseI. Los residuos de las células fueron retirados por medio de centrifugación a 12000g durante 30 minutos a 4°C.

9.3.2 Etapa 2: Purificación por afinidad

La proteína fue purificada a partir de extracto de células crudo por afinidad en una columna Profinity (BIORAD, Bio-Scale Mini Profinity cartucho exacto 5 ml) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El extracto crudo fue cargado en un cartucho exacto Profinity de 5 ml equilibrado con fosfato de potasio 100 mM pH 7,6. La columna fue lavada con 10 volúmenes de columna del mismo regulador de pH e incubada 30 minutos con fosfato de potasio 100 mM pH 7,6, fluoruro 100 mM a temperatura ambiente. La proteína fue eluida de la columna con 2 volúmenes de columna de fosfato de potasio 100 mM pH 7,6. La etiqueta permaneció firmemente unida a la resina y la proteína purificada fue liberada. Las fracciones que contenían la proteína fueron depositadas y dializadas contra Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM y 10% glicerol pH 8.

La concentración de proteína fue medida usando el ensayo de proteína Bradford.

9.4 Ensayo de actividad L-serina transaminasa

Para el ensayo de actividad L-serina transaminasa aproximadamente 30 µg de enzima purificada fueron agregados a un regulador de pH que contiene regulador de pH Tris-HCl 50 mM pH 8,2, L-Serina 3 mM, ácido α-cetoglutarico 1 mM en un volumen total de 300 µl. La reacción fue incubada durante 60 minutos a 30°C. El producto de reacción (ácido hidroxipirúvico) fue medido directamente mediante LC-MS/MS.

9.5 Actividad de enzima purificada

Actividad de enzima purificada (mUI/mg)	
Ensayo de L-Serina transaminasa	186

Ejemplo 10

Demostración de la actividad 3-fosfohidroxipiruvato fosfatasa codificada por el gen GPP2 de *Saccharomyces cerevisiae*

10.1 Construcción de una cepa para caracterización de GPP2sc: BL21 (pPAL7-gpp2sc)

Para caracterizar la proteína GPP, el gen correspondiente es expresado a partir del vector de expresión pPAL7 (Bio-rad).

Para este propósito, el gen *gpp* es amplificado a partir del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* usando los oligonucleótidos pPAL7-gpp2sc F y pPAL7-gpp2sc R. El producto PCR es restringido usando las enzimas *HindIII* y *BamHI* y clonado en el vector pPAL7 restringido por las mismas enzimas de restricción. El vector resultante es nombrado pPAL7-gpp2sc.

pPAL7-gpp2sc F (SEC ID nº 86): cccAAGCTTTgATGGGATTGACTACTAAACCTCTATC con

- una región (negrita) homóloga a la secuencia (280680-280655) de la región del gen *gpp2* (secuencia de

referencia en el sitio web <http://www.yeastgenome.org/>),

- una región (subrayada) que contiene el sitio de restricción *HindIII*

5 pPAL7-kivDII R (SEC ID nº 87): gGGATCCCTTACCATTTC AACAGATCGTCCTTAGC con

- una región (negrita) homóloga a la secuencia (279928-279954) de la región del gen *gpp2* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.yeastgenome.org/>),

- 10 - una región (subrayada) que contiene el sitio de restricción *BamHI*.

El plásmido pPAL7-*gpp2sc* es después introducido en células BL21 (DE3) competentes (Invitrogen).

10.2 Sobreproducción de la proteína GPP2sc

15 La sobreproducción de la proteína GPP2sc se realizó aplicando el mismo protocolo que el ejemplo 7.2

10.3 Purificación de la proteína GPP2sc

20 10.3.1 Etapa 1: Preparación de extractos libres de células

Aproximadamente 294 mg de biomasa de *E. coli* fueron suspendidos en 45 ml de fosfato de potasio 100 mM pH 7,6, y una mezcla de inhibidor de proteasa. La suspensión de células (15 ml por tubo cónico) fue sonicada en hielo (Bandelin sonoplus, 70 W) en un tubo cónico de 50 ml durante 8 ciclos de 30 seg con intervalos de 30 seg. Después de la sonicación, las células fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con MgCl₂ 5 mM y 1UI/ml de DNaseI. Los residuos de las células fueron retirados por medio de centrifugación a 12000g durante 30 minutos a 4°C.

30 10.3.2 Etapa 2: Purificación por afinidad

La proteína fue purificada a partir del extracto de células crudo por afinidad en una columna Profinity (BIORAD, Bio-Scale Mini Profinity cartucho exacto 5 ml) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El extracto crudo fue cargado en un cartucho exacto Profinity de 5 ml equilibrado con fosfato de potasio 100 mM pH 7,6. La columna fue lavada con 10 volúmenes de columna del mismo regulador de pH e incubada toda la noche con fosfato de potasio 100 mM pH 7,6, fluoruro 100 mM a temperatura ambiente. La proteína fue eluida de la columna con 2 volúmenes de columna de fosfato de potasio 100 mM pH 7,6. La etiqueta permaneció firmemente unida a la resina y la proteína purificada fue liberada. Las fracciones que contenían la proteína fueron depositadas y dializadas contra fosfato de potasio 100 mM, NaCl 150 mM y 10% glicerol pH 8 y concentradas a una concentración de 0,22 µg/µl.

40 La concentración de proteína fue medida usando el ensayo de proteína Bradford.

10.4 Ensayo de actividad 3-fosfohidroxipiruvato fosfatasa

45 10.4.1 Síntesis química de 3-fosfohidroxipiruvato

La síntesis química de 3-fosfohidroxipiruvato ha sido descrita en la publicación:

CE Ballou ;H Hesse ;R Hesse ; (1956).The Synthesis and Properties of Hydroxypyruvic Acid Phosphate J Am Chem Soc., 78 (15), 3718-3720.

50 10.4.2 Ensayo de actividad 3-fosfohidroxipiruvato fosfatasa

El ensayo de actividad 3-fosfohidroxipiruvato fosfatasa se llevó a cabo con regulador de pH Tris-HCl 50 mM pH 8,2, MgCl₂ 5 mM, 3-fosfohidroxipiruvato 3,6 mM y aproximadamente 6 µg de enzima purificada (Gpp) en un volumen total de 300 µl. La reacción fue incubada durante 120 minutos a 30°C. El producto de reacción (ácido hidroxipirúvico) fue medido directamente por medio de LC-MS/MS.

10.5 Actividad de enzima purificada

	Actividad de enzima purificada (mUI/mg)
Ensayo de 3-fosfohidroxipiruvato fosfatasa	9

60

Ejemplo 11**Simulación de rendimientos máximos para producción de etilenglicol, 1,3-propanodiol y 1,4-butanodiol****11.1 Parámetros usados para simulaciones**

Se han realizado simulaciones con el software de los presentes inventores patentado METEX METOPT™. Se ha utilizado una red metabólica simplificada de *E. coli* que incluye una red metabólica central, vías metabólicas para todos los precursores de biomasa y vías de producción específicas como se describe anteriormente. Se ha usado una composición de biomasa clásica para *E. coli*. Para cada diol específico, se han realizado dos simulaciones. La primera para calcular un rendimiento máximo teórico (tomando en cuenta solamente la estequiometría del modelo, sin crecimiento y sin energía de mantenimiento). La segunda para calcular un rendimiento máximo práctico, tomando en cuenta un índice de crecimiento de $0,1 \text{ h}^{-1}$ y una energía de mantenimiento de $5 \text{ mmol}_{\text{ATP}} \cdot \text{g}_{\text{DW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Todas las simulaciones se han realizado con un índice de absorción específico de glucosa de $3 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{DW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Para etilenglicol y 1,3-propanodiol, se han realizado simulaciones en condiciones aeróbicas. Específicamente para 1,4-butanodiol, se han realizado simulaciones en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Para condiciones anaeróbicas, el índice de crecimiento no pudo ser impuesto a $0,1 \text{ h}^{-1}$. El índice de crecimiento es el índice de crecimiento máximo que se puede alcanzar de acuerdo con el ATP disponible.

11.2 Resultados de las simulaciones

	Etilenglicol	1,3-propanodiol	1,4-butanodiol (aeróbico)	1,4-butanodiol (anaeróbico)
Rendimiento teórico máximo (g/g)	0,69	0,60	0,50	0,50
Rendimiento práctico máximo (g/g)	0,50	0,39	0,35	0,45 ($\mu_{\text{max}}=0,03 \text{ h}^{-1}$)

Listado de secuencias

<110> METABOLIC EXPLORER SA
SOUCAILLE Philippe
BOISART Cédric

<120> MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE DIOLES

<130> D26977

<150> EP08173129.1

<151> 2008-12-31

<150> US61/141.699

<151> 2008-12-31

<160> 87

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Sitios de restricción Ptrc01-kivDII-TT07 (BamHI, HindIII, EcoRV)

<400> 1

ggatccatgc aagcttatgc gatatc

26

<210> 2

<211> 57

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> promotor Ptrc01

<400> 2

gagctgttga caattaatca tccggctcgt ataattgttg gaataaggag gtataac 57

5 <210> 3
<211> 1647
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> secuencia del gen kivDII optimizada para E. coli

<400> 3

atgtataaccg tgggtgatta tctgctggat cgtctgcatg aactgggcat tgaagaaatt	60
ttcggcgcttc cgggtgatta taatctgcag tttctggatc agattattag ccataaagat	120
atgaaatggg tgggtaatgc caatgaactg aatgcaagct atatggcaga tggttatgcc	180
cgtacaaaaa aagcagcagc atttctgacc acctttggtg ttggtgaact gagcgcagtt	240
aatggtctgg ctggtagcta tgcagaaaat ctgccggttg ttgaaattgt tggtagcccg	300
accagcaaag ttcagaatga aggcaaattt gtgcatacata cctggccga tggtgatttt	360
aaacatttca tgaaaatgca tgaaccggtt accgcagcac gtaccctgct gaccgcagaa	420
aatgcaaccg ttgaaattga tctgtttctg agcgcactgc tgaagaacg taaaccggtg	480
tatattaatc tgcgggtgga tgttgacga gcaaaagcag aaaaaccgag cctgccgctg	540
aaaaaagaaa atagcaccag caataccagc gatcaggaaa ttctgaataa aattcaggaa	600
tccctgaaaa acgcaaaaaa accgattgtg attaccggtc atgaaattat tagctttggc	660
ctggaaaaaa cgtttaccca gtttattagc aaaaccaaac tgcgattac caccctgaat	720
tttggtaaaa gcagcgttga tgaagcactg ccgagcttct tgggtattta taatggcacc	780
ctgagcgaac cgaatctgaa agaatttctg gaaagcgcag atttcattct gatgetgggt	840
gttaaactga ccgatagctc taccggtgca tttaccatc atctgaatga aaacaaatg	900
attagcctga atattgatga aggcaaaatt ttaaatgaac gcattcagaa ttttgatttt	960
gaaagcctga ttagcagcct gctggatctg agcgaaatcg aatataaagg caaatatatt	1020
gataaaaaac aggaagattt tgttcgagc aatgcactgc tgtctcagga tctctgttg	1080
caggcagttg aaaatctgac ccagagcaat gaaaccattg ttgcagaaca gggcaccagc	1140
ttttttggtg caagcagcat tttctgaaa agcaaaagcc attttatttg tcagccgctg	1200
tggggtagca ttggttatac ctttcggca gcaactggta gccagattgc agataaagaa	1260
agccgtcatc tctgttttat tgggtatggt agcctgcagc tgaccgttca ggaactgggt	1320
ctggccattc gcgaaaaaat taatccgatt tgccttatta tcaataatga tggctatacc	1380
gtggaacgtg aaattcatgg tccgaatcag agctataatg atattccgat gtggaattat	1440
agcaaaactg ccgaatcttt tgggtgcaac gaagatcgtg ttgtgagcaa aattgtgcgc	1500
accgaaaatg aatttgtgag cgtgatgaaa gaagcacagg cagatccgaa tctatgtat	1560
tggattgaac tgattctggc caaagaaggt gcaccgaaag ttctgaaaaa aatgggcaaa	1620
ctgttcgccg aacagaataa aagctaa	1647

	<210> 4	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia de Terminador T7Te	
	<400> 4	
10	attacgtaga agatcttcct ggctcacctt cgggtgggcc ttctg	46
	<210> 5	
	<211> 27	
15	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
20	<223> Sitios de restricción Ptrc01-kivDII-TT07 (SmaI, BamHI, EcoRI)	
	<400> 5	
	ccccgggatg cggatccatg cgaattc	27
25	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido PME101 F	
	<400> 6	
35	ccgacagtaa gacgggtaag cctg	24
	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> ADN	
40	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido PME101 R	
45	<400> 7	
	agcttagtaa agccctcgct ag	22
	<210> 8	
50	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
55	<223> Oligonucleótidos yqhD F	
	<400> 8	
	ttacgtaccc agcaaaggga gcaagtaatg aacaac	36
60	<210> 9	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
65	<220>	

	<223> Oligonucleótidos yqhD R	
	<400> 9	
5	aagatcttct tagcgggcgg cttcgatat ac	32
	<210> 10	
	<211> 100	
	<212> ADN	
10	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido DeltasdaA F	
15	<400> 10	
	gtcaggagta ttatcgtgat tagtctattc gacatgtta aggtggggat tggccctca	60
	tctcccata ccgtagggcc tgtaggctgg agctgctcg	100
20	<210> 11	
	<211> 103	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido DeltasdaA R	
	<400> 11	
	gggcgagtaa gaagtattag tcacaetgga ctttgattgc cagaaccaccg cgtgaggttt	60
30	cgcggtattt ggcgttcatg tcccatatga atatectcct aag	103
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sdaA F	
40	<400> 12	
	cagcggtcga ttcattctgcg	20
45	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido sdaA R	
	<400> 13	
	gaccaatcag cggaagcaag	20
55	<210> 14	
	<211> 98	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido DeltasdaB F	
	<400> 14	

ES 2 549 003 T3

	cggcattggc cttccagtt ctcataccgt tggaccaatg aaagcgggtg aacaatttac	60
	cgacgatctg attgcccggtg taggctggag ctgcttcg	98
5	<210> 15 <211> 100 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido DeltasdaB R <400> 15	
	cgcaggcaac gatcttcatt gccaggccgc cgcgagaggt ttgcggtac ttggcggtca	60
15	tatctttacc tgtttcgtac catatgaata tcttccttag	100
20	<210> 16 <211> 19 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sdaB F <400> 16	
	gcgtaagtac agcggtcac	19
30	<210> 17 <211> 22 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sdaB R <400> 17	
	cgatgccgga acaggctacg gc	22
40	<210> 18 <211> 98 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido DeltapykF F <400> 18	
	cccatccttc tcaacttaaa gactaagact gtcataaaaa agaccaaaat tgtttgcacc	60
50	atcggaccga aaaccgaatg taggctggag ctgcttcg	98
55	<210> 19 <211> 99 <212> ADN <213> artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido DeltapykF R <400> 19	

ES 2 549 003 T3

	ggacgtgaac agatgcggtg ttagtagtgc cgctcggtac caglgcacca gaaaccataa	60
	ctacaacgtc acctttgtgc atatgaatat cctccttag	99
5	<210> 20 <211> 22 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido pykF F <400> 20	
15	gcgtaacctt ttccctggaa cg	22
	<210> 21 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido pykF R <400> 21	
25	gcgttgctgg agcaacctgc cagc	24
	<210> 22 <211> 125 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido Ptrcl8-gpmA F <400> 22	
35	ccactgactt tcgccatgac gaaccagaac cagcttagtt acagccataa tatacctcct	60
	tattccacac agtatacgag ccggatgatt aatcgccaac agctctgtag gctggagctg	120
	cttcg	125
40	<210> 23 <211> 105 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido Ptrcl8-gpmA R <400> 23	
	ggttatgcgt aagcattgct gttgcttcgt cgcggcaata taatgagaat tattatcatt	60
50	aaaagatgat ttgaggagta agtatcatat gaatactctc cttag	105
	<210> 24 <211> 23 <212> ADN <213> artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido gpmA F	

	<400> 24	
5	ccttcctctt tcagcagctt acc	23
	<210> 25	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido gpmA R	
	<400> 25	
15	cgacgatcag cgcaaagtga aagg	24
	<210> 26	
20	<211> 126	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido Ptrcl8-gpmB R	
	<400> 26	
	cggcgtttcca ctgcgtttcca ccgtggcgga ctaggtatac ctgtaacata atatacctcc	60
	ttattccaca cagtatacga gccggatgat taatcgccaa cagctctgta ggctggagct	120
	gcttcg	126
30	<210> 27	
	<211> 106	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido Ptrcl8-gpmB F	
	<400> 27	
40	gcgggattgg tggtcgcaca gacaacttgg tgcataatca gcattactca gaaaattaac	60
	gttacagcag tatacggaaa aaaagccata tgaatatcct ccttag	106
	<210> 28	
45	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido gpmB F	
	<400> 28	
55	ccttacgacc aatctcatca ataccgg	27
	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> artificial	

<220>
 <223> Oligonucleótido gpmB R
 <400> 29
 5 gcaataccat gactcaccag c 21
 <210> 30
 <211> 100
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido DeltametA F
 15 <400> 30
 ttcgtgtgcc ggacgageta cccgcggtca atttcttgcg tgaagaaaac gtctttgtga 60
 tgacaacttc tctgcggtct tctaggttgg agctgcttgc 100
 20 <210> 31
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido DeltametA R
 <400> 31
 atccagcggt ggattcatgt gccgtagatc gtatggcggt atctggtaga cgtaatatgt 60
 30 gagccagttg gtaaaccagta catatgaata tcttccttag 100
 <210> 32
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido metA F
 40 <400> 32
 tcacctcaa catgcaggct cgacattggc 30
 <210> 33
 45 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> Oligonucleótido metA R
 <400> 33
 ataaaaaagg caccgaagg tgcctgaggt 30
 55 <210> 34
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>

	<223> Oligonucleótido BspHlthra	
	<400> 34	
5	ttatcatgag agtgttgaag ttcggcggta catcagtggc	40
	<210> 35	
	<211> 39	
	<212> ADN	
10	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Smalthra	
15	<400> 35	
	ttaccgggc cgccgccccg agcacatcaa acccgacgc	39
	<210> 36	
20	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido PME101 F	
	<400> 36	
	ccgacagtaa gacgggtaag cctg	24
30	<210> 37	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido PME101 R	
	<400> 37	
40	agcttagtaa agccctcgct ag	22
	<210> 38	
	<211> 57	
45	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido ThrA SF for	
50	<400> 38	
	cgtatttccg tgggtctgat tacgcaattc tctccgagt actcaatcag ttctgc	57
55	<210> 39	
	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido ThrA SF rev	
	<400> 39	
65	gcagaaactg attgagtact cggaagagaa ttgcgtaatc agcaccacgg aaatacg	57

	<210> 40		
	<211> 50		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido HpalupthrL F		
	<400> 40		
10	cgtagttaac gaattcccaa ctagtgcac catacaacta ataaacgtgg	50	
	<210> 41		
	<211> 90		
15	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido BstZ17IupthrL R		
20	<400> 41		
	cccgggggag ggcggcgagg atccgggtat accagaaagg cccacccgaa ggtgagccag	60	
	gaaggtaacc agttcagaag ctgctatcag	90	
25	<210> 42		
	<211> 91		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
30	<220>		
	<223> Oligonucleótido BamHIdownthrC F		
	<400> 42		
	tcttggtctc ccttcgggtg ggccctttctg gtataccggg atccgggggc gctccccccg	60	
35	ggaatctatt cattatctca atcaggccgg g	91	
	<210> 43		
	<211> 40		
	<212> ADN		
40	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido HpaldownthrC R		
45	<400> 43		
	cgtagttaac gaattcgaga atgcccagg gaaagatctg	40	
	<210> 44		
50	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
55	<223> Oligonucleótido BstZ17ICm F		
	<400> 44		
	ggggatact gtaggctgga gctgcttcg	29	
60	<210> 45		
	<211> 29		

<212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido BamHICm R

 <400> 45

 cgcgatccc atatgaatat cctccttag 29
 10
 <210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido thrA*1 F

 <400> 46
 20
 cgtgttcgt gttaccaact cg 22

 <210> 47
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido thrA*1 R
 30
 <400> 47

 cggaaactga cgctccgca g 21
 35
 <210> 48
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial
 40
 <220>
 <223> Sitios de restricción Ptrc01-aaoro (KpnI, EcoRI, SmaI)

 <400> 48
 45 ggtaccgaat tccccggg 18

 <210> 49
 <211> 69
 <212> ADN
 50 <213> artificial

 <220>
 <223> promotor Ptrc01 y RBS
 55
 <400> 49

 gagctgttga caattaatca tccggctcgt ataattgttg gaaggatccc ccgggtaagg 60
 aggtataa 69
 60
 <210> 50
 <211> 1605
 <212> ADN
 <213> artificial
 65
 <220>
 <223> Secuencia del gen aaoro optimizada para E. coli (AY053450.)

<400> 50

5 atggcattta cccgtcgcag ctttatgaaa ggtctgggtg caaccgggtg tgcaggtctg 60
 jcatatgggtg caatgagcac cctgggtctg gcaccgtcta cagcagcacc ggcacgtacc 120
 tttcagccgc tggcagccgg tgatctgatt ggtaaagtga aaggtagcca tagcggttgtt 180
 gttctgggtg glggcccgga aggtctgtgt agcgcatctg aactgcagaa agccgggtat 240
 aaagttaccg ttctggaaag acgtaccggt ccgggtgggtc gtgtttggac cgcacgtggg 300
 ggtagcgaag aaaccgatct gagcgggtgaa acccagaaat gtacctttag cgaaggccat 360
 ttttataatg ttggtgccac ccgtattccg cagagccata ttaccctgga ttattgtcgc 420
 gaactgggtg ttgaaattca gggtttcggc aatcaaaatg ccaatacctt tgtgaattat 480
 cagagcgata ccagcctgag cggtcagagc gttacctatc gtgcagcaaa agcagatacc 540
 tttggctata tgagcgaact gctgaaaaaa gcaaccgatc aggggtgact ggatcagggtt 600
 ctgagccgtg aagataaaga tgcaactgag gaatttctga gcgatttttg tgatctgtct 660
 gatgatgggtc gtlatctggg tagcagccgt cgtgggttatg atagcgaacc gggtagccgt 720
 ctgaattttg gcaccgaaaa aaaaccgttt gccatgcagg aagttattcg tagcgggtatt 780
 ggtagcaatt ttagctttga ttttggtat gatcaggcca tgatgatgtt tacaccggtt 840
 ggtggtatgg atcgtattta ttatgccttt caggatcgta ttggcactga taacatcgtg 900
 ttcgggtgccg aagttaccag catgaaaaat gttagcgaag gtgtgaccgt tgaatatacc 960
 gcaggcggtg gcaaaaaaag cattaccgca gattatgcca tttgtaccat tctccgcgt 1020
 ctggttggtc gtctgcagaa taatctgcct ggtgatgttc tgaccgcact gaaagcagca 1080
 aaaccgagca gcagcggtaa actgggtatt gaatatagcc gtogttgggtg ggaaaccgaa 1140
 gatcgcatct atggtgggtc aagcaatacc gataaagata ttagccagat tatgtttccg 1200
 tatgatcatt ataatacgga tcgtgggtgtt gttgttgcat attatagctc tggtaaaccg 1260
 caggaagcat ttgaaagcct gaccatcgt cagcgtctgg caaaagcaat tgcagaaggc 1320
 agcgaatttc acggcgaaaa atataccggt gatattagca gcagctttag cggtagctgg 1380
 cgtcgtacca aatatagcga aagcgcgtg gcaattggg caggtagcgg tggttctcat 1440
 ggtggtgcag ccactccgga atatgaaaaa ctgctggaac cggtaggataa aatttatctt 1500
 gccggtgatc atctgagcaa tgcaatcgca tggcagcatg gtgcactgac cagcgcacgt 1560
 gatgttggtt cccatattca tgaacgtgtt gcacaggaag cctaa 1605

<210> 51

<211> 37

10 <212> ADN

<213> artificial

<220>

15 <223> Sitios de restricción Ptrc01-aaoro (BglII, EcoRV, PaeI, SacI, XbaI, HindIII)

<400> 51

	gatctgatat ctttaattaag agctctctag aaagctt	37
5	<210> 52 <211> 100 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido DeltaaceBAK F <400> 52	
	ctggcttttca caaggccgta tggcgagcag gagaagcaaa ttcttactgc cgaagcggta	60
15	gaattttctga ctgagctggt tgtaggctgg agctgcttcg	100
	<210> 53 <211> 99 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido DeltaaceBAK R <400> 53	
25	aacatctttcc acatgccctt cacgtatgcg gttttgtagt gcgcgccagt aatcagcgcg	60
	gaacagggtcg gcgtgcatcc atatgaatat cctccttag	99
30	<210> 54 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido aceBAK F <400> 54	
	cgtaagcga ttcagcacct tacc	24
40	<210> 55 <211> 27 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido aceBAK R <400> 55	
50	aacgcattac ccactctgtt taatacg	27
55	<210> 56 <211> 100 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido DeltasucCD F <400> 56	
60		

ES 2 549 003 T3

	tttttgcccg ctatggetta ccagcaccgg tgggtllatgc ctgtactact ccgcgcgaag	60
	cagaagaagc cgcttcaaaa catatgaata tectccttag	100
5	<210> 57 <211> 100 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido DeltasucCD R <400> 57	
	atatccgccca ggctgcgaac ggttttcaccg cctgcggcctt ccagagcagc gaattttctca	60
	tcgcagtcct ctttaccggc tctaggtctg agctgcttcg	100
15	<210> 58 <211> 28 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sucCD F <400> 58	
25	tcgcgaatcc gtgggcttcc tggtaacg	28
30	<210> 59 <211> 29 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Oligonucleótido sucCD R	
35	<400> 59 cctctgatgc caaccgaaga gatgagccg	29
40	<210> 60 <211> 97 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Oligonucleótido DeltaarcA F	
45	<400> 60 ccgcacatt cttatcggtg aagacgagtt ggtaacacgc aacacgttga aaagtatttt	60
50	cgaagcggaa ggctatgtgt aggctggagc tgcttcg	97
55	<210> 61 <211> 99 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Oligonucleótido DeltaarcA R	
60	<400> 61	

ES 2 549 003 T3

	ccagatcacc gcagaagcga taacettcac cgtgaatggt ggcatgatt tccggcglat	60
	cggcgctaga ttcgaaatgc atatgaatat cctccttag	99
5	<210> 62 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido arcA F <400> 62	
	cgacaattgg attcaccacg	20
15	<210> 63 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido arcA R <400> 63	
25	gcggtattga aaggttggtg c	21
30	<210> 64 <211> 70 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido DeltagdhA F <400> 64	
	taaacaacat aagcacaatc gtattaatat ataagggttt tatatctatg tgtaggctgg	60
	agctgcttcg	70
40	<210> 65 <211> 70 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido DeltagdhA R <400> 65	
	taagcgtagc gccatcaggc atttacaact taaatcacac cctgcgccag catatgaata	60
50	tctccttag	70
55	<210> 66 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido Ptrc-gdhAver F <400> 66	

	ccttaacggt attgtctctg c	21
	<210> 67	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido gdhA R	
	<400> 67	
	ggaggaagcc ccagagcagg	20
15	<210> 68	
	<211> 125	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido adhE2Ca F	
	<400> 68	
	ggtagccgat ccgggcccca gctgttgaca attaatcatc cggctcgtat aatgtgtgga	60
	attgtgagcg gataacaatt tacgtataag gaggtatatt atgaaagtta caaatcaaaa	120
25	agaac	125
	<210> 69	
	<211> 124	
	<212> ADN	
30	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido adhE2Ca R	
35	<400> 69	
	gagctcaagc ttaacagata aaacgaaagg cccagtcctt cgactgagcc ttctgtttta	60
	ttttagtcct agggctagct cttagattaat taaaatgatt ttatatagat atccttaagt	120
	tcac	124
40	<210> 70	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> Oligonucleótido prep F	
	<400> 70	
50	tctagaggat ccaagttcaa caggagagca ttatg	35
	<210> 71	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido prep R	

	<400> 71		
	ggatccgcta gccctaggta cgtactactc ttccatcgcc tggc	44	
5	<210> 72 <211> 62 <212> ADN <213> artificial <220>		
10	<223> Oligonucleótido yeaB F		
	<400> 72		
	agctgtatac tagaattcat agatcttaag gaggtatatt atggaatacc gtagcctgac	60	
15	gc	62	
	<210> 73 <211> 129 <212> ADN <213> artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido yeaB R		
	<400> 73		
25	gcttataagc cagctggctc tagatagcag aaaggccac ccgaaggta gccaggagta	60	
	tacatgaagc atttccgtta attaacggag ctcctctag gtcagggttt cacaccaatt	120	
	tgcagcgcc	129	
	<210> 74 <211> 31 <212> ADN <213> artificial		
30	<220> <223> Oligonucleótido serA F		
35	<400> 74		
	ctagtctaga ttagtacagc agacgggcgc g	31	
40	<210> 75 <211> 35 <212> ADN <213> artificial		
45	<220> <223> Oligonucleótido serA R		
	<400> 75		
50	tccccggga agctccgctc agggcgtggt gaccg	35	
	<210> 76 <211> 39 <212> ADN <213> artificial		
55	<220> <223> Oligonucleótido pPAL7-kivDII F		
60	<400> 76		

	cccaagcttt gacttctatg tataccgtgg gtgattatc	39
5	<210> 77 <211> 34 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Oligonucleótido pPAL7-kivDII R	
10	<400> 77	
	ggaattctta gcttttattc tggcggcga acag	34
15	<210> 78 <211> 101 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido DeltayqhDF <400> 78	
	atgaacaact ttaatctgca caccccaacc cgcatttctgt ttggtaaagg cgcaatcgct	60
25	ggttttacgag aacaaattcc gtgtaggctg gagctgcttc g	101
30	<210> 79 <211> 101 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Oligonucleótido DeltayqhD R	
35	<400> 79	
	ttagcgggag gcttcgtata tacggcggct gacatccaac gtaatgtcat gattttcggc	60
	cagttgggtc atgccgtgct ccatatgaat atcctcctta g	101
40	<210> 80 <211> 33 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Oligonucleótido yqhD F	
45	<400> 80	
50	ggcgtctcgc catacaaaa acgcacatcg ggc	33
55	<210> 81 <211> 29 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Oligonucleótido yqhD R	
60	<400> 81	
	gggcttgcc gacacctct tcgttctg	29

	<210> 82		
	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido yqhD F pTRC99A F		
	<400> 82		
10	cgatgcacgt catgaacaac ttaatctgc acacccaac ccg	43	
	<210> 83		
	<211> 70		
15	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido yqhD R pTRC99A R		
20	<400> 83		
	ggcgtaaaaa gcttagcggg cggcttcgta tatacggcgg ctgacatcca acgtaatgtc	60	
	gtgatttttcg	70	
25	<210> 84		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
30	<220>		
	<223> Oligonucleótido pPAL7-serC F		
	<400> 84		
35	cccaagcttt gatggctcaa atctcaatt ttagttctgg	40	
	<210> 85		
	<211> 35		
	<212> ADN		
40	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido pPAL7-serC R		
45	<400> 85		
	ggaattctta accgtgacgg cggtcgaact caacc	35	
	<210> 86		
50	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
55	<223> Oligonucleótido pPAL7-gpp2sc F		
	<400> 86		
	cccaagcttt gatgggattg actactaaac ctctatc	37	
60	<210> 87		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> artificial		

<220>

<223> Oligonucleótido pPAL7-kivDII R

5 <400> 87

gggataccta ccattcaac agatcgtcct tagc

34

10

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo genéticamente modificado para la bioproducción de un diol alifático seleccionado de entre etilenglicol, 1,3-propanodiol y 1,4-butanodiol,

en el que el microorganismo comprende una vía metabólica para la descarboxilación de un metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático seleccionado de entre hidroxipiruvato, 4-hidroxi-2-cetobutirato y 5-hidroxi-2-cetopentanoato, respectivamente, con una enzima codificada por el gen *kivD* de *Lactococcus lactis*, siendo además el producto obtenido a partir de dicha etapa de descarboxilación reducido en el diol alifático correspondiente con una enzima codificada por el gen *yqhD* de *Escherichia coli*, y

en el que el microorganismo es modificado genéticamente para la producción mejorada de dicho metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático.

2. Microorganismo según la reivindicación 1, seleccionado de entre el grupo que consiste en bacteria, levadura y hongo.

3. Microorganismo según una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que es seleccionado de entre *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomyetaceae* y *Corynebacteriaceae*.

4. Microorganismo según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el diol alifático es el etilenglicol y el metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático es el hidroxipiruvato.

5. Microorganismo según la reivindicación 4, en el que la producción mejorada de hidroxipiruvato se obtiene mediante por lo menos una de las modificaciones siguientes:

- Atenuar la expresión de los genes *gpmA* y/o *pgmI*;
- Incrementar la expresión de los genes *serA* y/o *serC*;
- Mutar el gen *serA* para obtener un alelo resistente a la retroalimentación;
- Incrementar la expresión de los genes *yeaB* o *serB*;
- Introducir e incrementar la expresión del gen *GPP2* de *S. cerevisiae*;
- Atenuar la expresión de los genes *sdaA* y/o *sdaB* y/o *tdcG* y/o *cysE* y/o *trpAB* y/o *glyA*;
- Atenuar la expresión de los genes *ghrA* o *hyi*;
- Atenuar la expresión de los genes *ItaE* o *aldA/aldB*;
- Atenuar la expresión de los genes *pykA* y *pykF*;
- Incrementar la expresión del gen *ppsA*.

6. Microorganismo según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el diol alifático es el 1,3-propanodiol y el metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático es el 4-hidroxi-2-cetobutirato.

7. Microorganismo según la reivindicación 6, en el que la producción mejorada de 4-hidroxi-2-cetobutirato se obtiene mediante por lo menos una de las modificaciones siguientes:

- Incrementar la expresión del gen *ppc*;
- Atenuar la expresión de los genes *pckA* y/o *maeA* y/o *maeB*;
- Incrementar la expresión de los genes *thrA* y *asd*;
- Mutar el gen *thrA* para obtener un alelo resistente a la retroalimentación;
- Incrementar la expresión del gen *serC*;
- Atenuar la expresión de los genes *thrB* y *thrC*, y/o *metA* y/o *dapA*;
- Atenuar la expresión de los genes *aldA* y *aldB*;
- Atenuar la expresión de los genes *pykA* o *pykF*;
- Incrementar la expresión del gen *ppsA*.

8. Microorganismo según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el diol alifático es el 1,4-butanodiol y el metabolito de ácido hidroxi-2-ceto-alifático es el 5-hidroxi-2-cetopentanoato.

9. Microorganismo según la reivindicación 8, en el que la producción mejorada de 5-hidroxi-2-cetopentanoato se obtiene mediante por lo menos una de las modificaciones siguientes:

- Incrementar la expresión del gen *ppc*;
- Atenuar la expresión de los genes *pckA* y/o *maeA* y/o *maeB*;
- Incrementar la expresión de los genes *gltA* y/o *icd*;
- Atenuar la expresión de los genes *sucAB* o *sucCD* y/o *aceA* o *aceB*;
- Atenuar la expresión del gen *arcA*;
- Incrementar la expresión del gen *prpE*;
- Atenuar la expresión de los genes *gdhA* y *gltB*;

- Atenuar la expresión de los genes *aldA* y *aldB*;
- Atenuar la expresión de los genes *ack* y *pta*.

5 10. Método para la producción fermentativa de un diol alifático seleccionado de entre etilenglicol, 1,3-propanodiol y 1,4-butanodiol, que comprende las etapas siguientes:

- cultivar un microorganismo según una de las reivindicaciones 1 a 9 en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono y

10 - recuperar el diol alifático del medio de cultivo.

11. Método según la reivindicación 10, en el que el diol es purificado adicionalmente.

15 12. Método según una de las reivindicaciones 10 u 11, en el que la fuente de carbono se selecciona de entre hexosas, pentosas, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, melaza, almidón, hemicelulosas, glicerol y combinaciones de los mismos.

13. Método según la reivindicación 12, en el que la fuente de carbono se selecciona de entre glucosa y sacarosa.

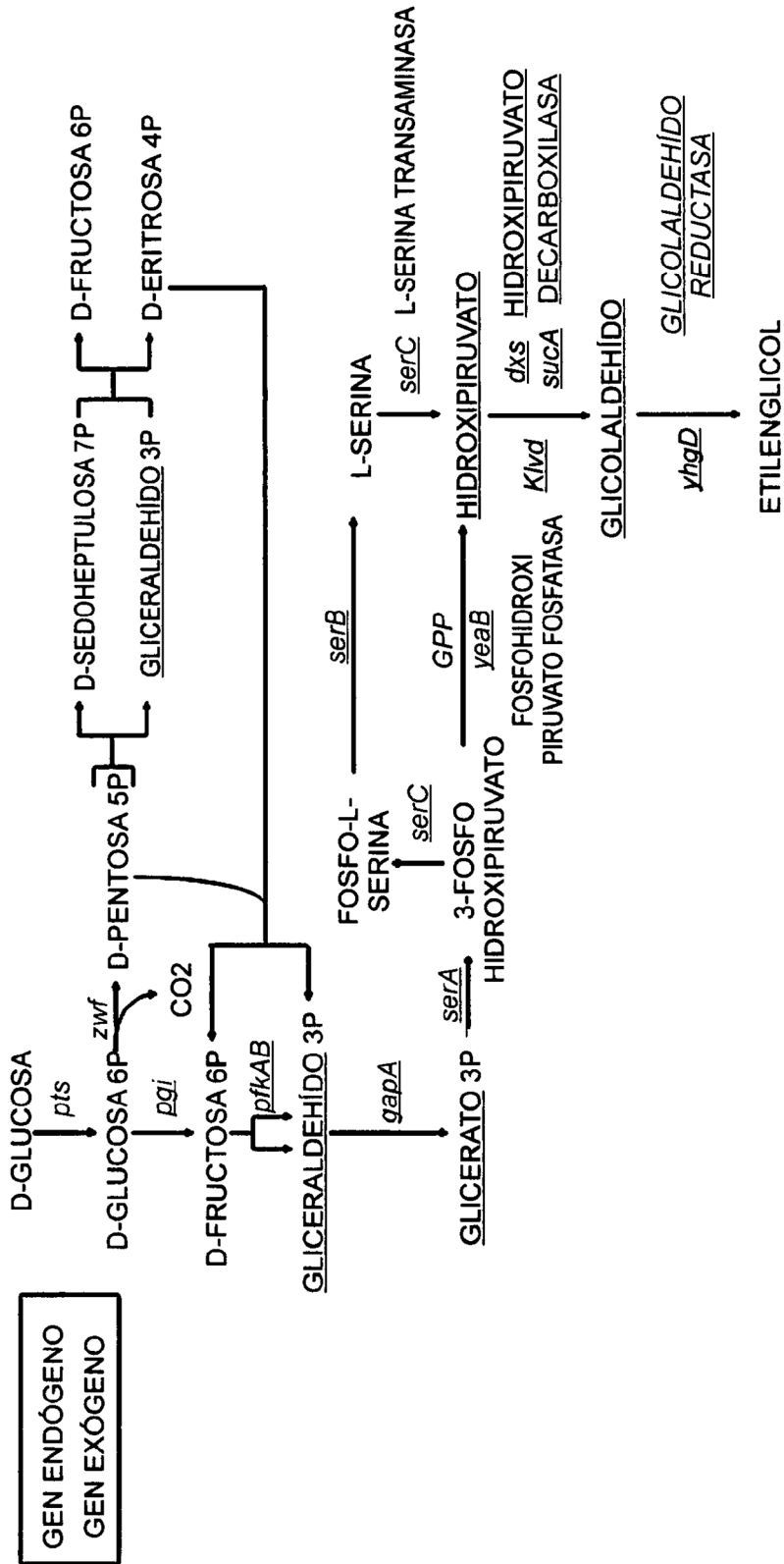


FIG. 1

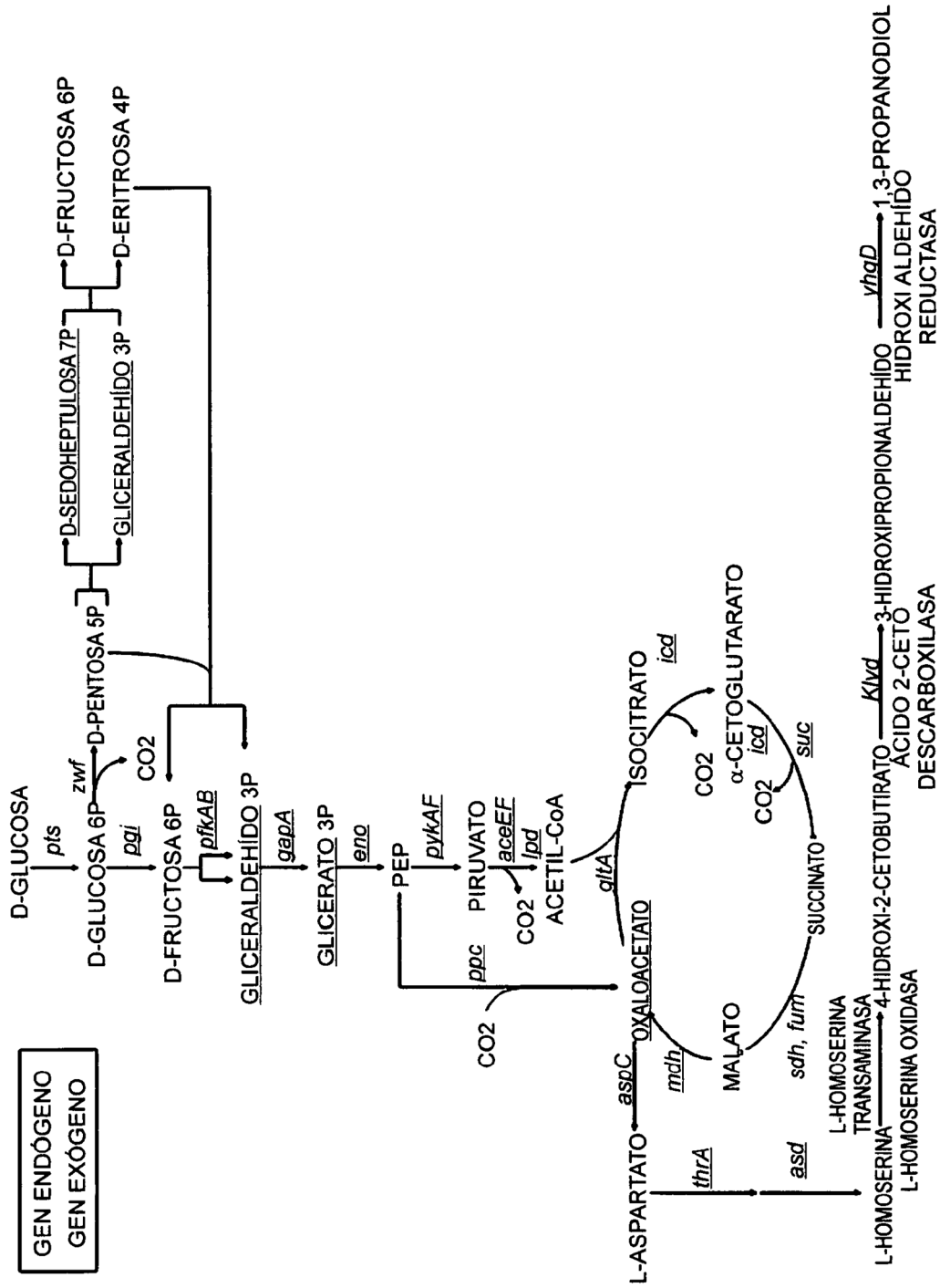


FIG. 2

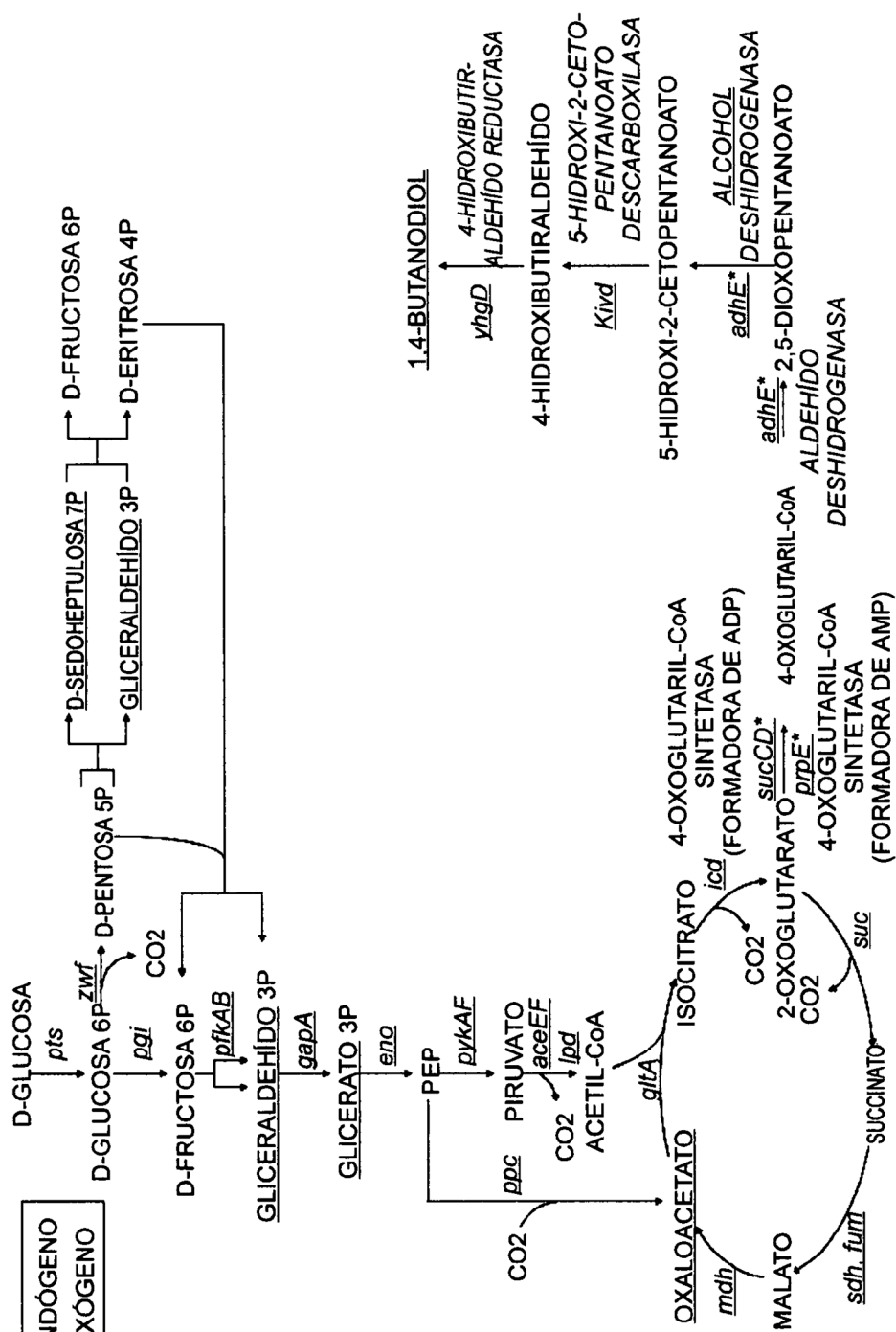


FIG. 3

Gen	Organismo	Número de acceso
Pdc2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NC_003076 REGION: complemento(22327913..22329987)
Pdc3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NC_003076 REGION: complemento(132318..134861)
Pdc	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NC_001988 REGION: 24954..26618
aceA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 4215132..4216436
aceB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 4213501..4215102
aceK	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 4216619..4218355
arcA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(4637613..4638329)
asd	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(3571798..3572901)
cysE	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(3779764..3780585)
dapA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(2596904..2597782)
dkgA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 3154645..3155472
dkgB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 229167..229970
fucO	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(2929887..2931038)
galP	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 3086306..3087700
gdhA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 1840395..1841738
gltA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(752408..753691)
gltB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 3352654..3357207
glyA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(2682276..2683529)
gpmA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(786066..786818)
gpmB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 4631820..4632467
icd	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 1194346..1195596
lrp	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 931818..932312
maeA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(1551996..1553693)
maeB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(2574120..2576399)
metA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 4212303..4213232
pckA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 3530840..3532462
ppc	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(4148470..4151121)
ppsA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(1782758..1785136)
pykA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 1935673..1937115
pykF	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 1753722..1755134
sdaA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 1894956..1896320
sdaB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 2927598..2928965
serA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(3055200..3056432)
serC	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 956876..957964
sucA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 757929..760730
sucB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 760745..761962
sucC	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 762237..763403
sucD	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 763403..764272
thrA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 337..2799
thrB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 2801..3733
thrC	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 3734..5020
trpA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(1314440..1315246)
trpB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(1315246..1316439)
yqhD	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 3153377..3154540

Fig 4-1

Kivd	<i>Lactococcus lactis</i>	AJ746364
Aro10	<i>Pichia stipitis</i>	NC_009046 REGION: complemento(1053281..1055152)
Pdc1	<i>Pichia stipitis</i>	NC_009068 REGION: 1765715..1767920
Pdc2	<i>Pichia stipitis</i>	NC_009068 REGION: complemento(285510..287347)
ADH1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NC_001147 REGION: complemento(159548..160594)
ADH2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NC_001145 REGION: complemento(873290..874336)
Aro10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NC_001136 REGION: 1234210..1236117
Pdc1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NC_001144 REGION: complemento(232391..234082)
Pdc5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NC_001144 REGION: 410724..412415
Pdc6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NC_001139 REGION: complemento(651294..652985)
Thi3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NC_001136 REGION: complemento(310642..312471)
pdc	<i>Zymomonas mobilis</i>	NC_006526 REGION: complemento(1373405..1375111)
yeaB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 1894194..1894772
aldA	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: 1486256..1487695
aldB	<i>Escherichia coli</i>	NC_000913 REGION: complemento(3754534..3752996)
aao	<i>Rhodococcus opacus</i>	NC_012522 REGION: complemento(1799119..1800723)

Fig 4-2