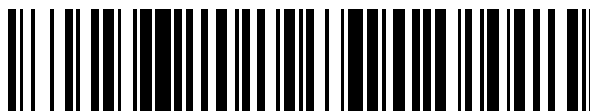


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 361**

51 Int. Cl.:

C12P 7/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2008** **E 08714209 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 2126101**

54 Título: **Microorganismos y procedimientos para la producción de 1,2-propanodiol y acetol**

30 Prioridad:

23.03.2007 WO PCT/IB2007/001677

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

06.11.2015

73 Titular/es:

METABOLIC EXPLORER (100.0%)
Biopole Clermont-Limagne
63360 Saint Beuzire, FR

72 Inventor/es:

SOUCAILLE, PHILIPPE;
MEYNIAL-SALLES, ISABELLE;
VOELKER, FRANÇOIS y
FIGGE, RAINER

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 550 361 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

Microorganismos y procedimientos para la producción de 1,2-propanodiol y acetol.

5 **Introducción**

La presente invención se refiere a un microorganismo modificado y a su utilización para la preparación de 1,2-propanodiol y/o acetol.

10 El 1,2-propanodiol o propilenglicol, un dialcohol C3, es un producto químico muy utilizado. Es un componente de resinas de poliéster no saturado, detergentes líquidos, refrigerantes y líquidos anticongelantes y de deshielo para aviones. El propilenglicol se ha utilizado cada vez más desde 1993-1994 como un producto de sustitución para los derivados del etileno, considerados más tóxicos que los derivados del propileno.

15 En la actualidad, el 1,2-propanodiol se produce químicamente mediante un procedimiento de hidratación del óxido de propileno que requiere grandes cantidades de agua. El óxido de propileno puede producirse mediante dos procedimientos: utilizando epiclorohidrina o hidroperóxido. Ambos utilizan sustancias de elevada toxicidad. Asimismo, la vía con hidroperóxido genera subproductos como el *tert*-butanol y el 1-feniletanol. Para que la producción de propileno sea óptima, se debe encontrar un uso para estos subproductos. La vía química
20 generalmente produce 1,2-propanodiol racémico, mientras que los dos estereoisómeros, (R)1,2-propanodiol y (S)1,2-propanodiol, son de interés para determinadas aplicaciones (por ejemplo materiales de inicio quirales para productos químicos y productos farmacéuticos especializados).

25 El acetol o hidroxiacetona (1-hidroxi-2-propanona) es un cetoalcohol C3. Este producto se utiliza como agente reductor en el teñido en tanques en la industria textil. Puede ventajosamente sustituir al azufre tradicional que contiene agentes reductores para reducir de esta forma el contenido de azufre en las aguas residuales, perjudicial para el medioambiente. El acetol es también un material de inicio en la industria química utilizado, por ejemplo, para producir polioles o moléculas heterocíclicas. Asimismo, tiene interesantes propiedades quelantes y disolventes.

30 En la actualidad, el acetol se produce principalmente mediante oxidación catalítica o deshidratación del 1,2-propanodiol. Se han propuesto nuevos procedimientos a partir de materias primas renovables como el glicerol (ver los documentos DE4128692 y WO 2005/095536). Actualmente, el coste de la producción química del acetol reduce sus aplicaciones industriales y mercados.

35 Las desventajas de los procedimientos químicos para la producción de 1,2-propanodiol y/o acetol hacen que la síntesis biológica sea una alternativa interesante. Los microorganismos caracterizan dos vías para la producción natural de estos productos a partir de azúcares.

40 En la primera vía, 6-desoxiazúcares (por ejemplo L-ramnosa o L-fucosa) se separan en fosfato de dihidroxiacetona y (S)-lactaldehído, que se pueden reducir a su vez en (S)-1,2-propanodiol (Badia et al, 1985). Esta vía es funcional en *E. coli*, pero no es económicamente viable debido al elevado coste de las desoxihexosas.

45 La segunda vía es el metabolismo de azúcares comunes (por ejemplo glucosa o xilosa) a través de la ruta de la glucólisis seguida de la ruta del metilglioxal. El fosfato de dihidroxiacetona se convierte en metilglioxal, que se puede reducir a lactaldehído o acetol. Estos dos compuestos pueden someterse entonces a una segunda reacción de reducción que da lugar a 1,2-propanodiol. Esta vía es utilizada por los productores naturales de (R)-1,2-propanodiol, como *Clostridium sphenoides* y *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*. La *Clostridium sphenoides* se utiliza para producir 1,2-propanodiol a una valoración de 1,58 g/l en condiciones limitadas de fosfato (Tran Din y Gottschalk, 1985). La *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum* también ha sido analizada para la producción de
50 1,2-propanodiol (Cameron y Cooney, 1986, Sanchez-Rivera y col, 1987). El mejor rendimiento obtenido fue una valoración de 9 g/l y una producción a partir de glucosa de 0,2 g/g. Sin embargo, es muy probable que la mejora del rendimiento obtenido con estos organismos resulte limitada debido a la falta de disponibilidad de herramientas genéticas.

55 **Técnica anterior**

La *E. coli* presenta las capacidades genéticas necesarias para producir 1,2-propanodiol y acetol naturalmente. El documento WO 2007/073364 describe un procedimiento para obtener microorganismos evolucionados, que presentan un actividad de "1,2-propanodiol sintasa" mejorada.

60 La ruta biosintética para obtener 1,2-propanodiol se inicia a partir del fosfato de dihidroxiacetona que se origina como producto intermedio en la glucólisis. Este producto intermedio metabólico se puede convertir en metilglioxal mediante la sintetasa de metilglioxal codificada por el gen *mgsA* (Cooper, 1984, Töttemeyer y col, 1998). El metilglioxal es un electrófilo extremadamente tóxico que puede reaccionar con los centros nucleófilos de las macromoléculas, como por ejemplo ADN, ARN y proteínas. Puede inhibir el crecimiento bacteriano y provocar la muerte celular en concentraciones muy bajas (0,3 a 0,7 mM). Por este motivo, se han analizado las vías existentes

para la desintoxicación del metilglioal (Ferguson y col, 1998). En bacterias, especialmente en *E. coli*, se han identificado tres rutas:

- La primera es el sistema I-II de glioalasa dependiente de glutatión (codificada por los genes *gloA* y *gloB*) que convierte el metilglioal en D-lactato en dos etapas.
- La segunda es la enzima III de glioalasa independiente de glutatión que cataliza la conversión de metilglioal en D-lactato.
- El tercer sistema comprende la degradación del metilglioal mediante reductasas de metilglioal.

Este último sistema resulta relevante para la producción de 1,2-propanodiol. El metilglioal es un cetoaldehído C3, con un aldehído en C1 y una cetona en C2. Estas dos posiciones se pueden reducir a alcohol, produciendo respectivamente acetol (o hidroxiacetona), una molécula no quiral y lactaldehído, una molécula quiral que puede ser de forma L o D (ver la figura 1). Estas 3 moléculas (acetol, L-lactaldehído y D-lactaldehído) se pueden reducir posteriormente en la otra posición para obtener 1,2-propanodiol quiral.

Las rutas preferentemente utilizadas en *E. coli* no están bien establecidas en este momento. Una metilglioal reductasa, utilizando preferentemente NADPH como cofactor, se purificó y se caracterizó parcialmente en *E. coli* (Saikusa y col, 1987). El producto de esta reacción resultó ser lactaldehído. Misra y col. (1996) describieron la purificación de dos actividades de metilglioal reductasa que generan el mismo producto de acetol. Una actividad dependiente de NADPH puede ser una actividad de alcohol-deshidrogenasa mientras que la actividad dependiente de NADPH puede ser una reductasa de aldehído no específica. Altaras y Cameron (1999) demostraron que la glicerol-deshidrogenasa (*GldA*) codificada por el gen *gldA* de *E. coli* está activa en la reducción del metilglioal a (R)-lactaldehído y, asimismo, en la conversión de acetol en 1,2-propanodiol.

El gen *yghZ* se clonó a partir de *E. coli*, se realizó su expresión y se caracterizó la proteína (Grant, 2003). Mostró una alta actividad específica hacia el metilglioal con NADPH como cofactor, pero no se caracterizó el producto de la reacción. Ante una sobreexpresión, este gen confirió resistencia a la toxicidad del metilglioal.

El gen *yqhD* a partir de la *E. coli* que codifica una alcohol deshidrogenasa se sobreexpresa en una cepa de *E. coli* genomanipulada para la bioproducción de 1,3-propanodiol (documento WO 2004/033646). En esta cepa, la ruta de Entner-Doudoroff, como se presenta en la revisión de Conway (1992), se regula por disminución en combinación con el gen *yqhD* regulado por incremento.

Ko y col. (2005) investigaron de forma sistemática las 9 aldo-ceto reductasas de *E. coli* como candidatas para la conversión del metilglioal en acetol. Mostraron que 4 enzimas purificadas, YafB, YqhE, YeaE y YghZ, pudieron convertir metilglioal en acetol en presencia de NADPH. Según sus estudios, las metilglioal reductasas YafB, YeaE y YghZ son las más importantes para el metabolismo del metilglioal *in vivo* en cuanto a la desintoxicación. Di Luccio y col. (2006) demostraron que el producto del gen *ydjG* de *E. coli* está activo en el metilglioal con NADH, pero no se realizó la caracterización del producto de la reacción.

Se describe en el documento WO 2007/115228 un procedimiento para fermentar anaeróbicamente glicerol para producir 1,2-propanodiol, en el que se sobreexpresan una glicerol deshidrogenasa y una dihidroxiacetona cinasa en un microorganismo.

El grupo de Cameron (Cameron y col, 1998, Altaras y Cameron, 1999, Altaras y Cameron, 2000) y el grupo de Bennett (Huang y col, 1999, Berrios-Rivera y col, 2003) han realizado numerosas investigaciones sobre las modificaciones genéticas de *E. coli* para obtener un productor de 1,2-propanodiol utilizando fuentes de carbono simple. Estos estudios dependen de la expresión de uno o numerosos genes que codifican actividades enzimáticas en la ruta desde el fosfato de dihidroxiacetona al 1,2-propanodiol. Cameron y col. (1998) demostraron que la sobreexpresión del gen que codifica la aldosa reductasa del cristalino de las ratas o del gen *gldA* da lugar a la producción de menos de 0,2 g/l de 1,2-propanodiol. Se puede obtener una mejora de esta valoración mediante la coexpresión de dos genes *E. coli*: el *mgsA* y el *gldA*. Con esta combinación, se puede obtener una valoración de 0,7 g/l de 1,2-propanodiol (Altaras y Cameron, 1999). Se lograron nuevas mejoras en las valoraciones y producciones con la expresión de una ruta completa de 1,2-propanodiol en *E. coli* (Altaras y Cameron, 2000). Se realizó la sobreexpresión de tres genes *mgsA*, *gldA* y *fucO* en una cepa sin el gen que codifica la lactato deshidrogenasa (*ldhA*). Con esta combinación, los mejores resultados obtenidos por el grupo de Cameron son la producción de 1,4 g/l de 1,2-propanodiol en un cultivo anaerobio en matraz con un rendimiento de 0,2 g/g de glucosa consumida. Cuando se extrapoló en un fermentador anaerobio por lotes, la producción fue de 4,5 g/l de 1,2-propanodiol con una producción de 0,19 g/g a partir de glucosa. Los resultados obtenidos con el mismo enfoque, pero con valoraciones y producciones menores, también se describen en las patentes US nº 6.087.140, US nº 6.303.352 y el documento WO 98/37204. El grupo de Bennett utilizó también una cepa hospedadora de *E. coli* sin *ldhA* para la sobreexpresión del gen *mgs* de *Clostridium acetobutylicum* y del gen *gldA* de *E. coli*. Los cultivos en matraces en condiciones anaerobias produjeron una valoración de 1,3 g/l y una producción de 0,12 g/g, mientras que los cultivos microaerobios produjeron una valoración de 1,4 g/l con una producción de 0,13 g/g.

Bennet y San (2001), tras la revisión de las diferentes rutas para la producción de 1,2-propanodiol, sugieren como una opción posible someter a prueba la introducción en el interior de los microorganismos de otras metilglicoxal reductasas.

En esta etapa, todos estos resultados no son mejores que los obtenidos con las especies *T. Thermosaccharolyticum*.

Hasta ahora, no se ha descrito el uso de actividades endógenas de microorganismos y, en particular de *E. coli*, que convierten el metilglicoxal en acetol.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un microorganismo modificado que presenta un aumento de la actividad de metilglicoxal reductasa y a su utilización para la preparación de 1,2-propanodiol y/o acetol. La enzima de la metilglicoxal reductasa es el producto de un gen de microorganismos. El aumento de la actividad de metilglicoxal reductasa se obtiene mediante la sobreexpresión de un gen que participa en la conversión del metilglicoxal en acetol, *yqhD*.

La actividad de las sintetasas de metilglicoxal también aumenta por la sobreexpresión del gen *mgsA*.

Según la invención, la ruta de Entner-Doudoroff se elimina mediante la supresión del gen *edd* o *eda*, o de ambos. Además, la síntesis de subproductos no deseados resulta mitigada mediante la atenuación de la expresión de los genes que codifican las enzimas que participan en la síntesis del lactato a partir de metilglicoxal (como por ejemplo, *gloA*, *aldA*, *aldB*), lactato a partir de piruvato (*ldhA*), formiato (*pflA*, *pflB*), etanol (*adhE*) y acetato (*ackA*, *pta*, *poxB*).

Preferentemente, la mitad de la glucosa se metaboliza a fosfato de dihidroxiacetona y, eventualmente, a 1,2-propanodiol y/o acetol suprimiendo el gen *tpiA*. Opcionalmente, con un gen *tpiA* activo, la actividad del gliceraldehído-3-fosfato se reduce para redireccionar una parte del gliceraldehído-3-fosfato disponible hacia la síntesis del 1,2-propanodiol y/o acetol. En un aspecto de la invención, aumenta la eficiencia de la importación de azúcares, ya sea utilizando una importación de azúcares independiente del fosfoenolpiruvato (PEP) como la codificada por *galP* o proporcionando más PEP al sistema azúcar-fosfotransferasa. Lo que se obtiene eliminando las rutas que consumen PEP como piruvato-quinasa (codificadas por los genes *pykA* y *pykF*) y/o promoviendo la síntesis de PEP; por ejemplo, mediante la sobreexpresión del gen *ppsA* que codifica la sintetasa de PEP.

Específicamente para la producción de 1,2-propanodiol, el microorganismo se modifica opcionalmente para aumentar otras enzimas que convierten el fosfato de dihidroxiacetona en 1,2-propanodiol, como la glicerol-deshidrogenasa (codificada por *gldA*) y la óxidorreductasa de 1,2-propanodiol (codificada por *fucO*). Además, es importante que la enzima que convierte el piruvato en acetyl-coA sea resistente a las altas concentraciones de NADH descubiertas en condiciones anaerobias. Lo que se puede obtener mediante una mutación específica en el gen *lpd*. Finalmente, para prescindir del NADH para la reducción de acetol en 1,2-propanodiol, se pueden eliminar los genes *arcA* y *ndh*. El microorganismo utilizado para la preparación de 1,2-propanodiol es *Escherichia coli*. La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de 1,2-propanodiol mediante el cultivo del microorganismo modificado en un medio de crecimiento apropiado que tenga una fuente de carbono simple o complejo y mediante la recuperación y purificación del 1,2-propanodiol producido.

Específicamente para la producción de acetol, el gen que codifica la glicerol-deshidrogenasa es atenuado o eliminado, previniendo la formación de 1,2-propanodiol. El microorganismo utilizado para la preparación de acetol es *Escherichia coli*. Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la producción de acetol mediante el cultivo de dicho microorganismo modificado en un medio de crecimiento apropiado que contenga una fuente de carbono simple y mediante la recuperación y purificación del acetol producido.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos que se incorporan en y constituyen una parte de la presente memoria ejemplifican la invención y, junto con la descripción, son útiles para explicar los principios de esta invención.

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

La figura 2 muestra el perfil de elución de tres proteínas YQHD, YDHF y GLDA en una columna para cromatografía de intercambio aniónico a pH 7.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un microorganismo modificado útil para la producción de 1,2-propanodiol y/o

acetol a partir de una fuente de carbono, en el que dicho microorganismo a partir de la especie *Escherichia coli* está caracterizado por que presenta:

- una actividad de metil glioxal reductasa aumentada, obtenida mediante la sobreexpresión del gen *yqhD* a partir de *Escherichia coli*,
- una actividad de metil glioxal sintasa aumentada, obtenida mediante la sobreexpresión del gen *mgsA*, y
- la eliminación de por lo menos uno de los genes *edd*, *eda* implicados en la ruta de Entner-Doudoroff.

Como se usan en la presente memoria, los siguientes términos se pueden utilizar para la interpretación de las reivindicaciones y la memoria descriptiva.

Según la invención, los términos "cultivo", "crecimiento" y "fermentación" se utilizan indistintamente para indicar el crecimiento de bacterias en un medio de crecimiento apropiado que contenga una fuente de carbono simple.

El término "microorganismo modificado" se refiere a un microorganismo como una bacteria, una levadura o un hongo, que ha sido modificado para aumentar la actividad de metilglioxal reductasa. Dicha modificación incluye los medios habituales para la transformación de microorganismos con elementos genéticos, incluyendo la sustitución de genes o introducción de vectores para la expresión de los genes que participan en la reducción del metilglioxal. Incluye además mutagénesis aleatoria o dirigida del microorganismo en condiciones habituales para inducir dicha mutagénesis. También incluye procedimientos para la evolución de un microorganismo, como por ejemplo el procedimiento de evolución descrito en el documento WO 2004/076659.

El término "útil para la producción" se refiere a que el microorganismo produce los productos de interés mediante fermentación. La fermentación es un procedimiento clásico que se puede realizar en condiciones aerobias, microaerobias o anaerobias.

El término "fuente de carbono" según la presente invención indica cualquier fuente de carbono que pueden utilizar los expertos en la materia para soportar el crecimiento normal de un microorganismo y que pueden ser hexosas, pentosas, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, almidón o sus derivados, hemicelulosas, glicerol y combinaciones de las mismas.

Una "actividad enzimática aumentada" se refiere a que la actividad es superior a la actividad de la enzima silvestre, según la medición en el mismo microorganismo antes de cualquier modificación. El microorganismo no modificado correspondiente es un microorganismo que tiene las mismas características que el microorganismo modificado, a excepción de la modificación de la actividad de metilglioxal reductasa. La actividad de metilglioxal reductasa se puede medir utilizando los medios habituales, como por ejemplo el procedimiento descrito en Misra y col. (Molecular and Cellular Biochemistry 156: 117-124 (1996)) o Ko y col. (J. Bacteriol. 187: 5782-5789 (2005)).

Ventajosamente, la actividad de metilglioxal reductasa aumenta al menos un 50%, preferentemente al menos un 100%, en comparación con la actividad de metilglioxal reductasa del correspondiente microorganismo no modificado.

El aumento de la actividad de metilglioxal reductasa se logra mediante la sobreexpresión de al menos un gen que participa en la reducción del metilglioxal.

El término "expresión" se refiere a la transcripción y traducción de una secuencia de genes que propician la generación de la correspondiente proteína, producto del gen.

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

- 1- Sustitución del promotor natural de un gen por un promotor que induce un mayor nivel de expresión de dicho gen de interés.

Se puede obtener un mayor nivel de expresión sustituyendo el promotor natural de un gen por un promotor que induce una gran expresión génica en el microorganismo seleccionado. Dichos promotores para la *E. coli* son, por ejemplo, los promotores P_{trc}, P_{tac}, P_{lac}, el promotor de lambda cl o demás promotores conocidos por los expertos en la materia. Para otras especies de microorganismos, los expertos en la materia determinarán los promotores que se pueden utilizar.

- 2- Introducción de múltiples copias de dicho gen de interés que participa en la reducción del metilglioxal en el microorganismo:

- introduciendo un vector de expresión que presenta y expresa dicho gen de interés.
- introduciendo unas copias adicionales del gen en el cromosoma del microorganismo.

Según la invención, el gen *yqhD* es sobreexpresado. Dicho gen codifica una enzima que puede convertir metilglioxal

en acetol. Preferentemente el gen *yqhD* es sobreexpresado solo o en combinación con otros genes.

En otra forma de realización de la invención, se modifica además el microorganismo con aumento de la actividad de metilgloxal.

5 El microorganismo según la invención presenta un aumento de la actividad de metil glioal sintetasa. Esto se logra mediante un aumento de la expresión del gen *mgsA* que codifica la sintetasa de metilgloxal que participa en la conversión de la DHAP en metilgloxal.

10 Otra forma de lograr este aumento de la actividad enzimática es mediante la introducción de una mutación específica en el gen *mgsA*, permitiendo la traducción de un producto génico que presenta una mayor actividad que la proteína natural.

15 En el microorganismo según la invención, se atenúa al menos un gen que participa en la ruta de Entner-Doudoroff. La ruta de Entner-Doudoroff proporciona una vía alternativa, además de la glucólisis, para degradar glucosa en gliceraldehído-3-fosfato y piruvato. La atenuación de la ruta de Entner-Doudoroff asegura que la mayoría o, como mucho, toda la glucosa se degrade a través de la glucólisis y se utilice para la producción de 1,2-propanodiol.

20 Se atenúa la expresión de al menos uno de los siguientes genes: *edd*, *eda*.

El término "atenuación de la actividad de una enzima" se refiere a la disminución de la actividad de la enzima de interés, en comparación con la actividad observada en el mismo microorganismo antes de cualquier modificación. El experto en la materia conoce numerosos medios para obtener este resultado y, por ejemplo:

- 25 - Introducción de una mutación en el gen, disminuyendo el nivel de expresión de este gen o el nivel de actividad de la proteína codificada.
- Sustitución del promotor natural del gen por un promotor de baja resistencia, dando lugar a una expresión más baja.
- 30 - Uso de elementos que desestabilizan el correspondiente ARN mensajero o la proteína.
- Supresión del gen, en caso de no necesitar ninguna expresión.

35 El término "atenuación de la expresión de un gen" según la invención indica la supresión parcial o total de la expresión de un gen, del que posteriormente se dice que ha sido "atenuado". Esta supresión de la expresión puede ser una inhibición de la expresión del gen, una supresión de toda o parte de la región promotora necesaria para la expresión del gen o una supresión en la región codificadora del gen. Preferentemente, la atenuación de un gen es esencialmente la supresión total de ese gen, que se puede sustituir por un gen con marcador de selección que facilita la identificación, aislamiento y purificación de las cepas según la invención. Un gen se inactiva preferentemente mediante 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).

45 En otra forma de realización de la invención, se atenúa la actividad de al menos una enzima que participa en la conversión del metilgloxal en lactato. El propósito de esta atenuación es que la maquinaria celular utilice el metilgloxal disponible esencialmente para la síntesis de 1,2-propanodiol (véase la figura 1).

Los genes que participan en la conversión del metilgloxal en lactato son en particular:

- 50 - El gen *gloA* que codifica la glioalasa I, que cataliza la síntesis de lactoil-glutatión a partir de metilgloxal.
- Los genes *aldA* y *aldB* que codifican una lactaldehído-deshidrogenasa (que cataliza la síntesis de (S) lactato a partir de (S) lactaldehído).

55 Uno o más de estos genes se atenúan ventajosamente en el microorganismo. Preferentemente, el gen *gloA* se atenúa o se elimina completamente.

60 En el microorganismo de la invención, resulta preferido que se atenúe al menos una enzima que participa en la síntesis de subproductos como el lactato, etanol y formiato.

En particular, es ventajoso atenuar el gen *ldhA* que codifica la lactato-deshidrogenasa que cataliza la síntesis de lactato a partir de piruvato y el gen *adhE* que codifica la alcohol-aldehído deshidrogenasa que cataliza la síntesis de etanol a partir de acetyl-CoA.

65 De modo similar, es posible forzar al microorganismo a utilizar el complejo de piruvato-deshidrogenasa para producir

acetil-CoA de CO₂ y NADH a partir de piruvato, en lugar de acetil-CoA y formiato. Lo que se puede lograr atenuando los genes *pflA* y *pflB* que codifican la piruvato-formiato liasa.

En otra forma de realización específica de la invención, se previene la síntesis del subproducto de acetato atenuando al menos una enzima que participa en la síntesis. Resulta preferido evitar dicha síntesis de acetato para optimizar la producción de 1,2-propanodiol.

Para prevenir la producción de acetato, se atenúa de modo ventajoso al menos un gen seleccionado entre *ackA*, *pta* y *poxB*. Todos estos genes codifican las enzimas que participan en las diferentes rutas de biosíntesis de acetato (véase la figura 1).

En una forma de realización específica de la invención, se atenúa la actividad de triosa fosfato isomerasa. Preferentemente, este resultado se logra atenuando la expresión del gen *tpiA*. El gen *tpiA* codifica la enzima "triosa fosfato isomerasa" que cataliza la conversión de DHAP en gliceraldehído-3-fosfato (véase la figura 1). La atenuación de la expresión de este gen garantiza que la mitad de la glucosa metabolizada se convierte en 1,2-propanodiol y/o acetol.

En una forma de realización específica de la invención, se atenúa la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, también llamada GAPDH, es una de las principales enzimas que participan en la conversión glucolítica de la glucosa en ácido pirúvico. La atenuación de la enzima da lugar a la redirección de parte de la GA3P hacia la síntesis de 1,2-propanodiol y/o acetol. La producción de 1,2-propanodiol a través de la glucosa puede entonces ser mayor a 1 mol/mol. De forma ventajosa, la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es aproximadamente menor al 30% de la actividad habitual de una GAPDH silvestre, más preferentemente menor al 10%.

Preferentemente, se atenúa la expresión del gen *gapA* que codifica el GAPDH.

Preferentemente, en el microorganismo según la invención, aumenta la eficiencia de la importación de azúcares. Una gran atenuación de la expresión del gen *gapA* que provoca una disminución del flujo de carbono en la reacción del GAPDH en más del 50% trae como consecuencia la síntesis de menos de 1 mol de PEP por mol de glucosa importado. El PEP es necesario para el sistema de la azúcar-fosfotransferasa (PTS) habitualmente utilizado para la importación de azúcares simples a la célula, debido a que la importación se puede unir a una fosfotransferencia desde el PEP a la glucosa que produce glucosa-6-fosfato. De este modo, la reducción de la cantidad de PEP tendrá un impacto negativo sobre la importación de azúcares.

En una forma de realización específica de la invención, se puede importar el azúcar al microorganismo mediante un sistema de importación de azúcares independiente del fosfoenolpiruvato. El simportador de galactasa-protón codificado por el gen *galP* no implica que se pueda utilizar la fosforilación. En este caso, se debe fosforilar la glucosa importada mediante la actividad de glucosa cinasa codificada por el gen *glk*. Para promover esta ruta, se aumenta la expresión de al menos un gen seleccionado entre *galP* y *glk*. Como resultado, el PTS no es imprescindible. Se puede eliminar atenuando al menos un gen seleccionado entre *ptsH*, *ptsI* o *crr*.

En otra forma de realización específica de la invención, aumenta la eficiencia del sistema de la azúcar-fosfotransferasa (PTS) al aumentar la disponibilidad del metabolito fosfoenolpiruvato. Debido a la atenuación de la actividad del *gapA* y del menor flujo de carbono hacia el piruvato, se puede limitar la cantidad de PEP en la cepa modificada de la invención, lo que da lugar a una menor cantidad de glucosa que se transporta a la célula.

Existen varios medios que se pueden utilizar para aumentar la disponibilidad del PEP en una cepa del microorganismo. En particular, un medio es la atenuación de la reacción PEP → piruvato. Preferentemente, se atenúa al menos un gen seleccionado entre *pykA* y *pykF*, que codifica la enzima piruvato-quinasa, en dicha cepa para obtener este resultado. Otra forma de aumentar la disponibilidad del PEP es favoreciendo la reacción piruvato → PEP, catalizada por la fosfoenolpiruvato sintetasa mediante el aumento de la actividad de esta enzima. Esta enzima es codificada por el gen *ppsA*. Por lo tanto, preferentemente en el microorganismo, aumenta la expresión del gen *ppsA* de manera preferente. Ambas modificaciones pueden estar presentes en el microorganismo simultáneamente.

En una forma de realización específica de la invención, el microorganismo modificado está diseñado para producir principalmente 1,2-propanodiol. Este resultado se obtiene favoreciendo la conversión de acetol y otros precursores (por ejemplo, lactaldehído) en 1,2-propanodiol. Incluye:

- El aumento de la actividad de la glicerol-deshidrogenasa. Preferentemente, aumenta la expresión del gen *gldA*.
- El aumento de la actividad de óxidorreductasas de 1,2-propanodiol, preferentemente mediante el incremento de la expresión del gen *fucO*.

Especialmente en condiciones anaerobias o microaerobias, es ventajoso que la enzima que favorece el metabolismo del piruvato en acetil coA (en particular, el complejo de piruvato-deshidrogenasa) tenga baja sensibilidad a la inhibición por el NADH. La sensibilidad más baja se define en referencia a la sensibilidad de la enzima silvestre. Esta característica se puede lograr mediante una mutación específica en el gen *lpd* (que codifica la subunidad lipoamida-deshidrogenasa de PDC) que da lugar a la sustitución de la alanina 55 en la secuencia de la proteína de la enzima por la valina residual.

En condiciones anaerobias o microaerobias, aumenta de forma ventajosa la disponibilidad de NADH para la reducción de los precursores en 1,2-propanodiol. Esto se logra aliviando la represión en el ciclo de ácido tricarbónico mediada por el regulador global ArcA (codificado por el gen *arcA*). La concentración de NADH en la célula también puede aumentar mediante la inactivación de la NADH deshidrogenasa II codificada por el gen *ndh*. Por lo tanto, preferentemente, se atenúa la expresión de al menos un gen seleccionado entre *arcA* y *ndh*.

En otra forma de realización específica de la invención, el microorganismo es diseñado para producir principalmente 1,2-propanodiol. Preferentemente, este resultado se alcanza atenuando la actividad de al menos una enzima que participa en la conversión del acetol en 1,2-propanodiol. Preferentemente, se atenúa la expresión del gen *gldA*.

El microorganismo procede de la especie *Escherichia coli*.

La invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de 1,2-propanodiol, en el que un microorganismo procedente de la especie *Escherichia coli*, caracterizado por que presenta:

- una actividad de metil glioxal reductasa aumentada, obtenida mediante la sobreexpresión del gen *yqhD* procedente de *Escherichia coli*, y

- la eliminación de por lo menos uno de los genes *edd*, *eda* implicados en la ruta de Entner-Doudoroff

se hace crecer en un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente de carbono y el 1,2-propanodiol producido es recuperado. La producción de 1,2-propanodiol se realiza en condiciones aerobias, microaerobias o anaerobias.

Dicho microorganismo de la especie *Escherichia coli* crece en un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente de carbono simple.

En otra forma de realización, un microorganismo de la especie *Clostridium acetobutylicum* crece en un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente de carbono simple o complejo.

Ventajosamente, el 1,2-propanodiol recuperado es purificado adicionalmente.

La invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de acetol, en el que un microorganismo procedente de la especie *Escherichia coli*, caracterizado por que presenta:

- una actividad de metil glioxal reductasa aumentada, obtenida mediante la sobreexpresión del gen *yqhD* procedente de *Escherichia coli*, y

- la eliminación de por lo menos uno de los genes *edd*, *eda* implicados en la ruta de Entner-Doudoroff

crece en un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente de carbono simple, y el acetol producido es recuperado. La producción de acetol se realiza en condiciones aerobias o microaerobias, preferentemente en condiciones aerobias.

Ventajosamente, el acetol recuperado además se purifica.

Los expertos en la materia pueden definir fácilmente las condiciones de cultivo para el procedimiento de fermentación. En particular, las bacterias fermentan a temperaturas entre 20°C y 55°C, preferentemente entre 25°C y 40°C y preferentemente a aproximadamente 37°C para la *E. coli*.

Este procedimiento se puede realizar en un proceso discontinuo, en un proceso por lotes o en un proceso continuo.

“En condiciones aerobias” se refiere a que se proporciona oxígeno al cultivo disolviendo el gas en la fase líquida. Esto se puede lograr (1) rociando el oxígeno que contiene gas (por ejemplo, aire) en la fase líquida o (2) agitando el recipiente que contiene el medio de cultivo para transferir el oxígeno presente en el espacio superior a la fase líquida. Las ventajas de la fermentación en condiciones aerobias en lugar de condiciones anaerobias es que la presencia de oxígeno como aceptor de electrones mejora la capacidad de la cepa de producir más energía en forma de ATP para los procesos celulares. Por lo tanto, se mejora el metabolismo general de la cepa.

Las condiciones microaerobias se definen como las condiciones de cultivo en las que se disuelven bajos porcentajes de oxígeno (por ejemplo, utilizando una mezcla de gas que contiene entre 0,1 y 10% de oxígeno, completado con nitrógeno hasta llegar al 100%) en la fase líquida.

- 5 Las condiciones anaerobias se definen como las condiciones de cultivo en las que no se proporciona oxígeno al medio de cultivo. Las condiciones estrictamente anaerobias se logran rociando un gas inerte como el nitrógeno en el medio de cultivo para extraer rastros de otros gases. Se puede utilizar el nitrato como un aceptor de electrones para mejorar la producción de ATP de la cepa y mejorar su metabolismo.
- 10 El término "medio de crecimiento apropiado" según la invención indica un medio de composición molecular conocida adaptado al crecimiento del microorganismo. Por ejemplo: un medio de cultivo mineral de composición conocida adaptado a las bacterias utilizadas, conteniendo al menos una fuente de carbono. En particular, el medio de crecimiento mineral para la *E. coli* o *K. pneumoniae* puede, de esta manera, tener una composición idéntica o similar al medio M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **32**:120-128), medio M63 (Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) o un medio como el definido por Schaefer y col. (1999, *Anal. Biochem.* **270**: 88-96) y, en particular, el medio de cultivo mínimo denominado MPG descrito a continuación:

K₂HPO₄	1,4 g/l
Ácido nítrico triacético	0,2 g/l
Solución de oligoelementos*	10 ml/l
(NH₄)₂SO₄	1 g/l
NaCl	0,2 g/l
NaHCO₃	0,2 g/l
MgSO₄	0,2 g/l
Glucosa	20 a 100 g/l
NaNO₃	0,424 g/l
Tiamina	10 mg/l
FeSO₄, 7H₂O	50 mg/l
Extracto de levadura	4 g/l

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

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

- 25 La fuente de carbono utilizada para el cultivo de *E. coli* es, preferentemente, una fuente de carbono simple y puede ser arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa o xilosa. Una fuente de carbono simple especialmente preferida es la glucosa.

- 30 La invención se describe anteriormente, a continuación y en los ejemplos relacionados respecto a la *E. coli*. De este modo, los genes que se pueden atenuar, eliminar o sobreexpresar para las cepas iniciales y evolucionadas según la invención se definen principalmente utilizando la denominación de los genes de la *E. coli*.

REFERENCIAS (en orden de aparición en el texto)

- 35 1. Badia J, Ros J, Aguilar J (1985), *J. Bacteriol.* **161**: 435-437.
2. Tran Din K y Gottschalk G (1985), *Arch. Microbiol.* **142**: 87-92
3. Cameron DC y Cooney CL (1986), *Bio/Technology*, **4**: 651-654
- 40 4. Sanchez-Rivera F, Cameron DC, Cooney CL (1987), *Biotechnol. Lett.* **9**: 449-454
5. Cooper RA (1984), *Annu. Rev. Microbiol.* **38**: 49-68
- 45 6. Töttemeyer S, Booth NA, Nichols WW, Dunbar B, Booth IR (1998), *Mol. Microbiol.* **27**: 553-562
7. Ferguson GP, Töttemeyer S, MacLean MJ, Booth IR (1998), *Arch. Microbiol.* **170**: 209-218
8. Saikusa T, Rhee HI, Watanabe K, Murata K, Kimura A (1987), *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1893-1899
- 50 9. Misra K, Banerjee AB, Ray S, Ray M (1996), *Mol. Cell. Biochem.* **156**: 117-124
10. Altaras NE y Cameron DC (1999), *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1180-1185

11. Grant AW, Steel G, Waugh H, Ellis EM (2003), *FEMS Microbiol. Lett.* **218**: 93-99
12. Conway T (1992), *FEMS Microbiology Reviews* 103 : 1-28
13. Di Luccio E, Elling RA, Wilson DK (2006), *Biochem. J.* **400**: 105-114
14. Ko J, Kim I, Yoo S, Min B, Kim K, Park C (2005), *J. Bacteriol.* **187**: 5782-5789
15. Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw AJ (1998), *Biotechnol. Prog.* **14**: 116-125
16. Altaras NE y Cameron DC (2000), *Biotechnol. Prog.* **16**: 940-946
17. Huang K, Rudolph FB, Bennett GN (1999), *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3244-3247
18. Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN (2003), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 34-40
19. Bennett GN y San KY (2001), *Applied Microbiol Biotechnol*, 55:1-9
20. Datsenko KA y Wanner BL (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6640-6645
21. Anderson EH (1946), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **32**:120-128
22. 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
23. Schaefer U, Boos W, Takors R, Weuster-Botz D (1999), *Anal. Biochem.* **270**: 88-96
24. Wiesenborn DP, Rudolph RB, Papoutsakis ET (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 2717-2722
25. Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R (1982), *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1318-1324
26. Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P (1994), *J. Bacteriol.* **176**: 1443-1450

Ejemplos

Ejemplo 1: Extracción, purificación e identificación de las enzimas que participan en la reducción del metilgloxal en la cepa de *E. coli* MG1655 *lpd, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ldhA::km*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd* cultivada en quimiostato**

a) Proceso de purificación de las enzimas dependientes de NADH o NADPH que participan en la reducción del metilgloxal:

El proceso completo de purificación diseñado para purificar las enzimas dependientes de NADH o NADPH que participan en la reducción del metil está formado por cinco etapas. En cada etapa, las enzimas diana se detectaron mediante ensayos de actividad enzimática. Se determinaron dos actividades enzimáticas: 1) Reducción del metilgloxal dependiente de NADPH, 2) Reducción del metilgloxal dependiente de NADH.

- 1) Se recolectó biomasa microbiana a partir de cultivos en quimiostato de la *E. coli* MG1655 *lpd** *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ldhA::km*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd* (para la construcción de la cepa, consultar el documento WO 2005/073364) llevados a cabo ya sea en condiciones estrictamente anaerobias o en condiciones microaerobias.
- 2) Las células se recogieron mediante centrifugación, se lavaron dos veces con un tampón HEPES 50 mM (pH 7,5) con 5 mM de DTT, resuspendidas en el mismo tampón antes de su almacenamiento a -20°C.
- 3) Las células se fragmentaron mediante aplicación de ultrasonidos (a 0°C, en condiciones anaerobias, en cuatro ciclos de 30 s con intervalos de 2 minutos entre cada ciclo en presencia de inhibidores de proteasas). Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación y los ácidos nucleicos presentes en el homogeneizado celular se precipitaron mediante un tratamiento con estreptomicina sulfato o se hidrolizaron mediante un tratamiento enzimático (benzonasa) (tabla I).

Tabla 1: Influencia de los tratamientos con benzonasa o estreptomina sulfato (negrita) del homogeneizado celular sobre las actividades enzimáticas que participan en la reducción del metilgloxal:

Actividades evaluadas	Actividad específica U/mg		Actividad enzimática total U	
Reducción del metilgloxal dependiente de NADPH	0,13	0,043	0,095	0,120
Reducción del metilgloxal dependiente de NADH	0,285	0,149	0,209	0,408

5 Según la tabla 1, el tratamiento con estreptomina sulfato es más eficaz, dando lugar a una actividad específica más elevada. Permite extraer los contaminantes (ácidos nucleicos y proteínas no deseadas) mientras que mantiene las actividades biológicas de la enzima de interés.

10 4) El homogeneizado celular tratado con estreptomina sulfato se centrifugó y se aplicó a una columna para cromatografía de intercambio aniónico (Ressource Q, Amersham Bioscience) conectada a un sistema purificador AKTA y equilibrada con un tampón HEPES con 50 mM de DTT. La separación de proteínas se realizó a pH 7 o 7,5 u 8. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente continuo de KCl (2%) y se recolectaron como fracciones separadas.

15 5) Las fracciones de elución que contienen las actividades enzimáticas se agruparon y aplicaron a una columna para cromatografía de interacción hidrófoba (fenil-sefarosa de Hitrap, Amersham Biosciences) equilibrada con un tampón HEPES 50 mM con 5 mM de DTT.

20 En caso de ser necesario, es posible añadir una etapa final de cromatografía de permeabilización en gel.

Después de cada etapa, se determinó la producción y el factor de purificación. Después de la última etapa de purificación, se separaron las proteínas restantes de las fracciones activas en un gel de poliacrilamida con SDS. La proteína de interés se identificó mediante la correlación de la actividad de la fracción con el diámetro de las manchas. La mancha de la proteína se extirpó, lavó y se digirió con una proteasa específica (digestión con tripsina) y estuvo sujeta a una espectrometría de masas (LC-MS/MS y MALDI) para su identificación.

b) Identificación de las enzimas que participan en la reducción del metilgloxal en la *E. coli* MG1655 *lpd, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, *ldhA::km*, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd cultivada en condiciones anaerobias:**

30 El proceso de purificación que utiliza una cromatografía de intercambio aniónico a pH 7 seguido de una cromatografía de interacción hidrófoba dio como resultado la identificación de dos enzimas dependientes de NADPH que reducen el metilgloxal: la YQHD (42KDa) codificada por el gen *yqhD* y la YDHF (33KDa) codificada por el gen *ydhF* (figura 2). Se descubrió una tercera enzima (la glicerol-deshidrogenasa codificada por el gen *gldA*) activa en la reducción de metilgloxal dependiente de NADH y NADPH.

35 Cuando se realizó la cromatografía de intercambio aniónico a pH 8 seguida de una cromatografía de interacción hidrófoba y de una etapa final de cromatografía de permeabilización en gel, se identificó otra enzima dependiente de NADPH que reduce el metilgloxal: la 2,5-diceto-D-gluconato reductasa B (29KDa) codificada por el gen *dkgB* (*yafB*).

c) Identificación de las enzimas que participan en la reducción del metilgloxal en la *E. coli* MG1655 *lpd, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, *ldhA::km*, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd cultivada en condiciones microaerobias:**

40 El proceso de purificación que utiliza una cromatografía de intercambio aniónico a pH 7,5 dio como resultado la identificación de una proteína 36 KDa denominada YCDW codificada por el gen *ycdW* que cataliza la reducción del metilgloxal dependiente de NADPH.

45 Cuando se realizó la cromatografía de intercambio aniónico a pH 7,5 seguida de una cromatografía de interacción hidrófoba, se identificaron dos nuevas enzimas dependientes de NADPH que catalizan la reducción del metilgloxal: la YQHD (42KDa) codificada por el gen *yqhD* (ya purificado en células que crecen en condiciones anaerobias) y la 2,5-diceto-D-gluconato reductasa A (31 KDa) codificada por el gen *dkgA* (*yqhE*).

Ejemplo 2: Introducción de las supresiones $\Delta yqhD$, $\Delta yafB$, $\Delta ydhF$ y $\Delta ycdW$ en la cepa de *E. coli* MG1655 *lpd, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, *ldhA::cm*, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd para evaluar la implicación de los genes en la reducción del metilgloxal.**

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

60 Se eliminó el casete de resistencia al cloranfenicol en la cepa de *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, *ldhA::km*, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd::cm$ según el protocolo 1.

Protocolo 1: Eliminación de los casetes de resistencia

Los casetes de resistencia al cloranfenicol y/o kanamicina se eliminaron según la siguiente técnica: El plásmido pCP20 que transporta la recombinasa FLP que actúa en los sitios FRT de los casetes de resistencia al cloranfenicol y/o kanamicina se introdujo en la cepa mediante electroporación. Después de un cultivo en serie a 42°C, se comprobó la pérdida de los casetes de resistencia al antibiótico mediante el análisis por PCR con los oligonucleótidos presentados en la tabla 2.

Se comprobó la presencia de las modificaciones anteriormente incorporadas en la cepa utilizando los oligonucleótidos presentados en la tabla 2.

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

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para comprobar la inserción de un casete de resistencia o la pérdida del casete de resistencia

Nombre de la región	Nombres de oligos	Identificador de secuencia	Homología con la región cromosómica
Gen <i>tpiA</i> (supresión)	cdh YIIQ	Nº1 Nº2	Véase WO2005073364
Gen <i>pflAB</i>	pflABF pflABR	Nº3 Nº4	Véase WO2005073364
Gen <i>adhE</i>	ychGf adhECr	Nº5 Nº6	Véase WO2005073364
Gen <i>ldhA</i> (inserción del casete)	hslJC ldhAC2	Nº7 Nº8	Véase WO2005073364
Gen <i>gloA</i>	NemACd Rnt Cr	Nº9 Nº10	Véase WO2005073364
Gen <i>aldA</i>	Ydc F C f gapCCr	Nº11 Nº12	Véase WO2005073364
Gen <i>aldB</i>	aldB C f YiaYCr	Nº13 Nº14	Véase WO2005073364
Gen <i>edd</i>	Eda d Zwf r	Nº15 Nº16	Véase WO2005073364
Gen <i>ldhA</i> (supresión)	ldhAF ldhAR	Nº17 Nº18	1439724 a 1439743 1441029 a 1441007
Gen <i>yqhD</i>	yqhDF yqhDR	Nº19 Nº20	3153060 a 3153092 3154817 a 3154789
Gen <i>yafB</i>	yafBF yafBR	Nº21 Nº22	228785 a 228804 230296 a 230276
Gen <i>ydHf</i>	ydHFF ydHFR	Nº23 Nº24	1722394 a 1722423 1723920 a 1723890
Gen <i>ycdW</i>	ycdWF ycdWR	Nº25 Nº26	1096789 a 1096809 1098297 a 1098277
Promotor <i>gapA</i> (Ptrc16-gapA)	yeaAF gapAR	Nº27 Nº28	1860259-1860287 1861068-1861040
Genes <i>edd</i> y <i>eda</i>	eddF edaR	Nº29 Nº30	1932996-1932968 1929754-1929777
Gen <i>pykA</i>	pykAF pykAR	Nº31 Nº32	1935338 a 1935360 1937425 a 1937401
Gen <i>pykF</i>	pykFF pykFR	Nº33 Nº34	1753371 a 1753392 1755518 a 1755495

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

Para eliminar el casete de resistencia a la kanamicina y para inactivar el gen *ldhA*, se introdujo el casete de resistencia al cloranfenicol en el gen *ldhA* eliminando la mayor parte del gen en cuestión según el protocolo 2.

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

Los oligonucleótidos seleccionados y presentados en la tabla 3 para la sustitución de un gen o una región intergénica se utilizaron para amplificar ya sea el casete de resistencia al cloranfenicol a partir del plásmido pKD3 o el casete de resistencia a la kanamicina a partir del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000)). El producto de la PCR obtenido se introdujo posteriormente mediante electroporación en la cepa receptora con el

plásmido pKD46 en donde el sistema λ Red ($\gamma\beta$, exo) expresado favorece en gran medida la recombinación homóloga. Posteriormente, se seleccionaron los transformantes resistentes al antibiótico y se comprobó la inserción del casete de resistencia mediante el análisis por PCR con los oligonucleótidos correspondientes presentados en la tabla 2.

5

Las otras modificaciones de la cepa se comprobaron con los oligonucleótidos presentados en la tabla 2.

La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta\text{ldhA}::\text{cm}\Delta\text{tpiA}$, ΔpflAB , ΔadhE , ΔgloA , ΔaldA , ΔaldB , Δedd .

10 Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para la sustitución de una región cromosómica mediante recombinación con un producto de la PCR en la cepa de *E. coli* MG1655

Nombre de la región	Nombres de oligos	Identificador de secuencia	Homología con la región cromosómica
Gen <i>ldhA</i>	DldhAF	N°35	1440865-1440786
	DldhAR	N°36	1439878-1439958
Gen <i>yqhD</i>	DyqhDF	N°37	3153369-3153448
	DyqhDR	N°38	3154532-3154452
Gen <i>yafB</i>	DyafBF	N°39	229167-229245
	DyafBR	N°40	229966-229887
Gen <i>ydhF</i>	DydhFF	N°41	1722760-1722840
	DydhFR	N°42	1723656-1723576
Gen <i>ycdW</i>	DycdWF	N°43	1097074-1097150
	DycdWR	N°44	1098047-1097969
Promotor <i>gapA</i> (Ptrc16-gapA)	Ptrc-gapAF	N°45	1860478-1860536
	Ptrc-gapAR	N°46	1860762-1860800
Genes <i>edd</i> y <i>eda</i>	DeddF	N°47	1932582-1932501
	DedaR	N°48	1930144-1930223
Gen <i>gloA</i>	GLOAD f	N°49	1725861-1725940
	GLOA D R	N°50	1726268-1726189
Gen <i>pykA</i>	DpykAF	N°51	1935756-1935836
	DpykAR	N°52	1937055-1937135
Gen <i>pykF</i>	DpykFF	N°53	1753689-1753766
	DpykFR	N°54	1755129-1755051

c) Construcción de una cepa modificada de *E. coli* MG1655 *lpd**, ΔtpiA , ΔpflAB , ΔadhE , ΔldhA , ΔgloA , ΔaldA , ΔaldB , Δedd , ΔyqhD

15

El gen *yqhD* se inactivó en la cepa de *E. coli* MG1655 *lpd**, ΔtpiA , ΔpflAB , ΔadhE , $\Delta\text{ldhA}::\text{cm}$, ΔgloA , ΔaldA , ΔaldB , Δedd mediante la inserción de un casete de resistencia a la kanamicina y la supresión de la mayor parte del gen en cuestión utilizando la técnica descrita en el protocolo 2 con los oligonucleótidos presentados en la tabla 3.

20

La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *lpd**, ΔtpiA , ΔpflAB , ΔadhE , $\Delta\text{ldhA}::\text{cm}$, ΔgloA , ΔaldA , ΔaldB , Δedd , $\Delta\text{yqhD}::\text{km}$.

Las otras modificaciones de la cepa se comprobaron con los oligonucleótidos presentados en la tabla 2.

25

Los casetes de resistencia al cloranfenicol y la kanamicina se eliminaron posteriormente según el protocolo 1.

La cepa obtenida se denominó *E. coli* MG1655 *lpd**, ΔtpiA , ΔpflAB , ΔadhE , ΔldhA , ΔgloA , ΔaldA , ΔaldB , Δedd , ΔyqhD .

30

d) Construcción de una cepa modificada de *E. coli* MG1655 *lpd**, ΔtpiA , ΔpflAB , ΔadhE , ΔldhA , ΔgloA , ΔaldA , ΔaldB , Δedd , ΔyafB

El gen *yafB* se inactivó en la cepa de *E. coli* MG1655 mediante la inserción de un casete de resistencia a la kanamicina y la supresión de la mayor parte del gen en cuestión utilizando la técnica descrita en el protocolo 2 con los oligonucleótidos presentados en la tabla 3. La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 $\Delta\text{yafB}::\text{km}$.

35

Se suprimió el gen *yafB* mediante la sustitución del gen por un casete de resistencia a la kanamicina en la cepa de *E. coli* MG1655 *lpd**, ΔtpiA , ΔpflAB , ΔadhE , $\Delta\text{ldhA}::\text{cm}$, ΔgloA , ΔaldA , ΔaldB , Δedd mediante la técnica de la transducción con el fago P1.

40

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

Se suprimió el gen seleccionado mediante la sustitución del gen por un casete de resistencia (kanamicina o cloranfenicol) en la cepa de *E. coli* receptora mediante la técnica de la transducción con el fago P1. El protocolo se realizó en dos etapas: (i) la preparación del lisado del fago en la cepa MG1655 con un único gen eliminado y (ii) la transducción de la cepa receptora mediante este lisado del fago.

Preparación del lisado del fago

- Siembra con 100 µl de un cultivo durante la noche de la cepa MG1655 con un único gen eliminado de 10 ml de LB + Cm 30 µg/ml + glucosa 0,2% + CaCl₂ 5 mM.
- Incubación durante 30 min a 37°C con agitación.
- Adición de 100 µl de lisado del fago P1 preparado en la cepa silvestre MG1655 (aprox. 1×10^9 fago/ml).
- Agitación a 37°C durante 3 horas hasta que todas las células estén lisadas.
- Adición de 200 µl de cloroformo, y agitar bien.
- Centrifugación durante 10 min a 4500 g para eliminar residuos celulares.
- Transferencia del sobrenadante en un tubo estéril y adición de 200 µl de cloroformo.
- Almacenamiento del lisado a 4°C.

Transducción

- Centrifugación durante 10 min a 1500 g de 5 ml de un cultivo durante la noche de la cepa receptora de *E. coli* en un medio LB.
- Suspensión del sedimento celular en 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM.
- Tubos de control: 100 µl de células
100 µl de fagos P1 de la cepa MG1655 con un único gen eliminado.
- Prueba con tubo ensayo: 100 µl de células + 100 µl de fagos P1 de la cepa MG1655 con un único gen eliminado.
- Incubación durante 30 min a 30°C sin agitación.
- Adición de 100 µl de citrato de sodio 1 M en cada tubo, y agitar bien.
- Adición de 1 ml de LB.
- Incubación durante 1 hora a 37°C con agitación.
- Preparación de cultivos en placas LB + Cm 30 µg/ml después de la centrifugación de tubos durante 3 min a 7000 rpm.
- Incubación a 37°C durante la noche.

A continuación, se seleccionaron los transformantes resistentes al antibiótico y se comprobó la inserción de la supresión mediante un análisis por PCR con los oligonucleótidos correspondientes presentados en la tabla 1.

Las otras modificaciones de la cepa se comprobaron con los oligonucleótidos presentados en la tabla 2.

La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *lpd**, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA::cm*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd*, *ΔyafB::km*.

Los casetes de resistencia al cloranfenicol y la kanamicina se eliminaron a continuación según el protocolo 1.

La cepa obtenida se denominó *E. coli* MG1655 *lpd**, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd*, *ΔyafB*.

e) Construcción de una cepa modificada de *E. coli* MG1655 *lpd, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd*, *ΔydhF***

El gen *ydhF* se inactivó en la cepa de *E. coli* MG1655 *lpd**, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA::cm*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd* mediante la inserción de un casete de resistencia al antibiótico kanamicina y la supresión de la mayor parte del gen en cuestión utilizando la técnica descrita en el protocolo 2 con los oligonucleótidos presentados en la tabla 3. La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *lpd**, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA::cm*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd*, *ΔydhF::km*.

Las otras modificaciones de la cepa se comprobaron con los oligonucleótidos presentados en la tabla 2.

Los casetes de resistencia al cloranfenicol y la kanamicina se eliminaron a continuación según el protocolo 1.

La cepa obtenida se denominó *E. coli* MG1655 *lpd**, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd*, *ΔydhF*.

f) Construcción de una cepa modificada de *E. coli* MG1655 *lpd, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd*, *ΔycdW***

El gen *ycdW* se inactivó en la cepa de *E. coli* MG1655 mediante la inserción de un casete de resistencia a la kanamicina y la supresión de la mayor parte del gen en cuestión utilizando la técnica descrita en el protocolo 2 con los oligonucleótidos presentados en la tabla 3. La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *ΔycdW::km*.

La eliminación del gen *ycdW* mediante la sustitución del gen por un casete de resistencia a la kanamicina en la cepa de *E. coli* MG1655 *lpd**, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA::cm*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd* se realizó mediante la técnica de la transducción con el fago P1 descrito en el protocolo 3.

Se obtuvo el lisado del fago P1 en la cepa MG1655 *ΔycdW::km* y la transducción de la cepa de *E. coli* MG1655 *lpd**, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA::cm*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd* se llevó a cabo utilizando este lisado del fago.

La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *lpd**, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA::cm*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd*, *ΔycdW::km*.

Las otras modificaciones de la cepa se comprobaron con los oligonucleótidos presentados en la tabla 2.

Los casetes de resistencia al cloranfenicol y la kanamicina se eliminaron a continuación según el protocolo 1.

La cepa obtenida se denominó *E. coli* MG1655 *lpd**, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd*, *ΔycdW*.

f) Cultivo de las cepas portadoras de las supresiones en los genes que codifican las metilgloxal reductasas identificadas

Se cultivaron las cuatro cepas portadoras de las supresiones *ΔyqhD*, *ΔyafB*, *ΔydhF* y *ΔycdW* en matraces de Erlenmeyer en condiciones microaerobias en el medio MPG a un pH de 6,7 y a 37°C.

Después de 72 h de cultivo, se midió la producción de acetol y 1,2-propanodiol mediante HPLC en el sobrenadante de los cultivos. Los resultados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Producción de 1,2-propanodiol y acetol en cepas portadoras de supresiones en los genes que codifican las metilgloxal reductasas (cada valor es una media de dos valores provenientes de dos cultivos diferentes)

Producto (mM)	Cepa <i>ΔydhF</i>	Cepa <i>ΔycdW</i>	Cepa <i>ΔyafB</i>	Cepa <i>ΔyqhD</i>	Cepa de control
1,2-propanodiol	10,7	16,3	8,1	0	16,7
Acetol	9,3	11,1	7,2	0	11,3
Suma	20,0	27,4	15,3	0	28,0

Los resultados demostraron que todas las metilgloxal reductasas identificadas tienen participación en la conversión del metilgloxal en acetol y, posteriormente, en 1,2-propanodiol. La supresión del *yqhD* dio lugar a una gran inhibición del crecimiento posiblemente debido a la acumulación de metilgloxal. Las supresiones de *yafB* y *ydhF* también tienen un importante impacto sobre la producción de acetol y 1,2-propanodiol.

Ejemplo 3: Construcción de cepas modificadas de *E. coli* MG1655 (pME101VB01-*yqhD*-*mgsA*-*gldA*), *E. coli* MG1655 (pME101VB01-*yafB*-*mgsA*-*gldA*) y *E. coli* MG1655 (pME101VB01-*yqhE*-*mgsA*-*gldA*)

Para aumentar la producción de 1,2-propanodiol, se expresaron diferentes combinaciones de genes a partir del plásmido pME101VB01 utilizando el promotor *trc*.

a) Construcción del plásmido pME101VB01

El plásmido pME101VB01 se obtuvo a partir del plásmido pME101 y presentó un sitio de clonación múltiple con secuencias de reconocimiento específicas para las endonucleasas de restricción poco frecuentes *NheI*, *SnaBI*, *PacI*, *BglII*, *AvrII*, *SacII* y *AgeI* seguido por el terminador de la transcripción *adc* de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824.

Para la expresión a partir de un vector de copia baja, se construyó el plásmido pME101 del siguiente modo: El plásmido *pCL1920* (Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15 pág. 4631-GenBank AX085428) se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos PME101F y PME101R y el fragmento *BstZ17I-XmnI* del vector *pTrc99A* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J) que lleva el gen *lacI* y se introdujo el promotor *trc* en el vector amplificado.

PME101F (identificador de secuencia N° 55):

ccgacagtaagacgggtaagcctg

PME101R (identificador de secuencia N° 56):

agcttagtaaagccctcgctag

Un enlazador de ácido nucleico de cadena doble sintético que comprende el sitio de clonación múltiple y el terminador de la transcripción *adc* se utilizó para generar pME101VB01. Se hibridaron dos oligonucleótidos de 100 bases que se utilizan como complemento, flanqueados por los sitios de restricción digeridos con *NcoI* o *HindIII*. El producto de 100 pares de bases se subclonó en el plásmido pME101 digerido con *NcoI/HindIII* para generar pME101VB01.

pME101VB01 1, formado por 100 bases (identificador de secuencia N° 57):

catgggctagctacgtattaattaagaatctcctagggagctcaccggtTAAAAATAAGAGTTACCTTAAATGGTAACTCTTATTTTTTTT
Aggcgcgcca

pME101VB01 2, formado por 100 bases (identificador de secuencia N° 58):

agcttggcgcgccTAAAAATAAGAGTTACCATTTAAGGTAAGTCTTATTTTTTAaccggtgagctccctaggagatctttaattaata
cgtagctagcc

con:

- una región (letras subrayadas en minúscula) correspondiente al sitio de clonación múltiple.
- una región (letras mayúsculas) correspondiente al terminador de la transcripción *adc* (secuencia 179847 a 179814) de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 *pSOL1* (NC_001988).

b) Construcción de plásmidos para la expresión de diferentes combinaciones de genes de la ruta biosintética de 1,2-propanodiol (pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA, pME101VB01-yafB-mgsA-gldA y pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA)

Los diferentes genes se amplificaron por PCR a partir del ADN genómico de *E. coli* MG1655 utilizando los oligonucleótidos presentados en la tabla 1.

Tabla 5: oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes de la ruta de 1,2-propanodiol.

Nombre del gen	Nombres de oligos	Identificador de secuencia	Homología con el gen	Sitios de restricción
<i>yqhD</i>	yqhDR2 yqhDF2	N°59 N°60	3153369-3153400 3154544-3154475	<i>BspHI</i> añadido <i>BspHI</i> eliminado <i>NheI</i> añadido
<i>mgsA</i>	mgsAF mgsAR	N°61 N°62	1026268-1026248 1025780-1025800	<i>SnaBI</i> añadido <i>BglII</i> añadido
<i>gldA</i>	gldAF gldAR	N°63 N°64	4136631-4136612 4135512-4135530	<i>AvrII</i> añadido <i>SacI</i> añadido
<i>yafB</i>	yafB F2 yafB R	N°65 N°66	229167-229190 229970-229950	<i>NcoI</i> añadido <i>NheI</i> añadido
<i>yqhE</i>	yqhE F yqhE R	N°67 N°68	3154641-3154661 3155464-3155444	<i>NcoI</i> añadido <i>NheI</i> añadido

Los fragmentos amplificados por PCR se cortaron con las enzimas de restricción mencionadas en la tabla 5 y se clonaron en los sitios de restricción del plásmido *pME101VB01*. Se construyeron los siguientes plásmidos: *pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA*, *pME101VB01-yafB-mgsA-gldA* y *pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA*.

A continuación, los plásmidos se introdujeron en la cepa de *E. coli* MG1655.

Ejemplo 4: Construcción de cepas modificadas de *E. coli* MG1655 *P_{trc16}-gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA*, *ΔpykA*, *ΔpykF* (*pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA*), (*pJB137-P_{gapA}-ppsA*), *E. coli* MG1655 *P_{trc16}-gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA*, *ΔpykA*, *ΔpykF* (*pME101VB01-yafB-mgsA-gldA*), (*pJB137-P_{gapA}-ppsA*) y *E. coli* MG1655 *P_{trc16}-gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA*, *ΔpykA*, *ΔpykF* (*pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA*), (*pJB137-P_{gapA}-ppsA*) con capacidad para producir 1,2-propanodiol con alto rendimiento

Se sustituyó el promotor *gapA* natural por el promotor *P_{trc16}* corto sintético (identificador de secuencia N° 69: gagctgttgcggaattaatcatccggctcgataatgtgtgg) en la cepa de *E. coli* MG1655 mediante la sustitución de 225 pb de la secuencia *gapA* en dirección 5' por FRT-CmR-FRT y un promotor genomanipulado utilizando la técnica descrita en el protocolo 2 con los oligonucleótidos presentados en la tabla 3.

Se comprobó la inserción del casete de resistencia mediante el análisis por PCR con los oligonucleótidos presentados en la tabla 2.

La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *P_{trc16}-gapA::cm*.

Los genes *edd-eda* se inactivaron en la cepa de *E. coli* MG1655 mediante la inserción de un casete de resistencia a la kanamicina y la supresión de la mayor parte de los genes en cuestión utilizando la técnica descrita en el protocolo 2 con los oligonucleótidos presentados en la tabla 3. La cepa obtenida se denominó *E. coli* MG1655 *Δedd-eda::km*.

Esta supresión se transfirió en la cepa de *E. coli* MG1655 *P_{trc16}-gapA::cm* según el protocolo 3.

La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *P_{trc16}-gapA::cm*, *Δedd-eda::km*.

Los casetes de resistencia al antibiótico se eliminaron a continuación según el protocolo 1.

Se construyó la cepa MG1655 *ΔgloA::cm* según el protocolo 2 con los oligonucleótidos presentados en la tabla 3 y se transfirió esta supresión en la cepa anteriormente construida según el protocolo 3. La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *P_{trc16}-gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA::cm*.

El gen *pykA* se inactivó en la cepa anterior mediante la inserción de un casete de resistencia a la kanamicina según el protocolo 2 con los oligonucleótidos presentados en la tabla 3. La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *P_{trc16}-gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA::cm*, *ΔpykA::km*.

Los casetes de resistencia al antibiótico se eliminaron a continuación según el protocolo 1.

El gen *pykF* se inactivó mediante la inserción de un casete de resistencia al antibiótico cloranfenicol según el protocolo 2 con los oligonucleótidos presentados en la tabla 3. La cepa resultante se denominó *E. coli* MG1655 *P_{trc16}-gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA*, *ΔpykA*, *ΔpykF::cm*.

El casete de resistencia al antibiótico se eliminó a continuación según el protocolo 1.

En cada etapa, se comprobó la presencia de todas las supresiones anteriormente construidas utilizando los oligonucleótidos presentados en la tabla 3.

Para aumentar la producción de fosfoenolpiruvato, el gen *ppsA* se expresó a partir del plásmido *pJB137* utilizando el promotor *gapA*. Para la construcción del plásmido *pJB137-P_{gapA}-ppsA*, el gen *ppsA* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de la *E. coli* MG1655 utilizando los siguientes oligonucleótidos:

1. *gapA-ppsAF*, formado por 65 bases (identificador de secuencia N° 70)

ccttttattcactaacaataagctggtggaatatATGTCCAACAATGGCTCGTCACCGCTGGTGC

con:

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

2. ppsAR, formado por 43 bases (identificador de secuencia N° 71)

aatcgcaagcttGAATCCGGTTATTTCTTCAGTTCAGCCAGGC

con:

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

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

1. *gapA*-ppsAR, formado por 65 bases (identificador de secuencia N° 72)

GCACCAGCGGTGACGAGCCATTGTTGGACATatattccaccagctattgttagtgaataaaagg

con:

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

2. *gapAF*, formado por 33 bases (identificador de secuencia N° 73)

ACGTCCCGGGcaagccaaaggaagagtgaggc

con:

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

Ambos fragmentos se fusionaron posteriormente utilizando los oligonucleótidos ppsAR y gapAF (Horton y col. 1989 Gene 77:61-68). El fragmento amplificado por PCR se cortó con las enzimas de restricción *HindIII* y *SmaI* y se clonó en los sitios *HindIII*/*SmaI* del vector *pJB137* (EMBL-entrada número: U75326) proporcionando el vector *pJB137-PgapA-ppsA*.

Los diferentes plásmidos pME101VB01 y pJB137-PgapA-ppsA se introdujeron en la cepa de *E. coli* MG1655 *P*trc16-*gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA*, *ΔpykA*, *ΔpykF*. Las cepas obtenidas se denominaron, respectivamente, *E. coli* MG1655 *P*trc16-*gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA*, *ΔpykA*, *ΔpykF*, pME101VB01-*yqhD-mgsA-gldA*, pJB137-PgapA-ppsA (cepa 1), *E. coli* MG1655 *P*trc16-*gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA*, *ΔpykA*, *ΔpykF*, pME101VB01-*yafB-mgsA-gldA*, pJB137-PgapA-ppsA (cepa 2) y *E. coli* MG1655 *P*trc16-*gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA*, *ΔpykA*, *ΔpykF*, pME101VB01-*yqhE-mgsA-gldA*, pJB137-PgapA-ppsA (cepa 3).

Ejemplo 5: Comparación entre las diferentes cepas para la producción de 1,2-propanodiol en condiciones aerobias.

Las cepas obtenidas como se describen en el ejemplo 4 (cepas 1, 2 y 3) y las cepas de control (control 1 : MG1655 pME101VB01-*yqhD-mgsA-gldA*, control 2 : MG1655 pME101VB01-*yafB-mgsA-gldA*, control 3 : MG1655 pME101VB01-*yqhE-mgsA-gldA* y control 4 : MG1655 *P*trc16-*gapA*, *Δedd-eda*, *ΔgloA*, *ΔpykA*, *ΔpykF*) se cultivaron en un ensayo con matraz de Erlenmeyer en condiciones aerobias en un medio mínimo con glucosa como fuente de carbono. El cultivo se realizó a 34°C o 37°C y el pH se mantuvo tamponando el medio de cultivo con MOPS. Al final del cultivo, 1,2-propanodiol, acetol y glucosa residual en el caldo de fermentación se analizaron mediante HPLC y se calcularon las producciones de 1,2-propanodiol a través de glucosa y 1,2-propanodiol + acetol a través de glucosa.

Cepa	Valoración del 1,2-propanodiol (g/l)	Valoración de la acetol (g/l)	Producción del 1,2-propanodiol (g/g glucosa)	Producción del 1,2-propanodiol + acetol (g/g glucosa)
Control 1	0,02	0	0,004	0,004
Control 2	0	0	0	0
Control 3	0,01	0	0,002	0,002
Control 4	0,05	0,34	0	0,04

Cepa 1	2,25	1,40	0,14	0,23
Cepa 2	1,64	1,31	0,10	0,18
Cepa 3	0,77	0,47	0,06	0,10

Listado de secuencias

5	<110> METABOLIC EXPLORER	
	<120> MICROORGANISMOS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE 1,2-PROPANODIOL Y ACETOL	
	<130> D25262	
10	<150> PCT/IB2007/001677	
	<151> 23-03-2007	
	<160> 73	
15	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
25	<400> 1	
	ggtgatgata gttatcgccg	20
	<210> 2	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> cebador de PCR	
	<400> 2	
	cgtgccatcg acagcagtcc	20
40	<210> 3	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 3	
50	agacattaaa aatatacgtg cagctacccg 30	
	<210> 4	
	<211> 30	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
60	<400> 4	
	gtgaaagctg acaacccttt tgatcttta	30

	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 5	
10	ggctcattgc accaccatcc ag	22
	<210> 6	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
20	<400> 6	
	gaaaagacgc gctgacaata cgcc	24
25	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 7	
35	gccatcagca ggcttagccg	20
	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
45	<400> 8	
	gggtattgtg gcatgtttaa ccg	23
	<210> 9	
50	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> cebador de PCR	
	<400> 9	
	gaagtggtcg atgccgggat tgaagaatgg g	31
60	<210> 10	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	

	<223> cebador de PCR	
	<400> 10	
5	gggttacgtt tcagtgaggc gcgttctgcg g	31
	<210> 11	
	<211> 31	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
15	<400> 11	
	tgcagcggcg cacgatggcg acgttccgcc g	31
	<210> 12	
20	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> cebador de PCR	
	<400> 12	
	cacgatgacg accattcatg cctatactgg c	31
30	<210> 13	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 13	
40	catatttccc tcaaagaata taaaaaagaa caattaacgc	40
	<210> 14	
	<211> 31	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
50	<400> 14	
	tatgttcacg cgatggcgca ccagctgggc g	31
55	<210> 15	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 15	
65	ccccggaatc agaggaatag tccc	24

	<210> 16	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 16	
10	gggtagactc cattactgag gcgtgggcg	29
	<210> 17	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
20	<400> 17	
	gccatcagca ggcttagcgc	20
25	<210> 18	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador específico	
	<400> 18	
35	gggtattgtg gcatgttaa ccg	23
	<210> 19	
	<211> 33	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
45	<400> 19	
	ggcgtctcgc catacaaaa acgcacatcg ggc	33
	<210> 20	
50	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> cebador específico	
	<400> 20	
	gggctttgcc gacaccttct tcgttcttg	29
60	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	

	<223> cebador específico	
	<400> 21	
5	cctgacccca tgccgaactc	20
	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
15	<400> 22	
	cccgttccc tcaatactg g	21
	<210> 23	
20	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> cebador específico	
	<400> 23	
	gtggatcaag atgccgcct gcggattccg	30
30	<210> 24	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador específico	
	<400> 24	
40	cccgtccaga gcccggtccg gggaattgc c	31
	<210> 25	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
50	<400> 25	
	ggcggtgagg gggggattcg	20
55	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador específico	
	<400> 26	
65	ccccatcaac cactcgggc c	21

	<210> 27	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador específico	
	<400> 27	
10	gccacagccg gaatcatact tggtttggg	29
	<210> 28	
	<211> 29	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
20	<400> 28	
	cgtaacacc aactcgtcc catttcagg	29
25	<210> 29	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 29	
35	gggtagactc cattactgag gcgtgggcg	29
	<210> 30	
	<211> 24	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
45	<400> 30	
	ccacatgata ccgggatggt gacg	24
	<210> 31	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> cebador de PCR	
	<400> 31	
	ggcaattacc ctcgacgtac cgg	23
60	<210> 32	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	

	<223> cebador de PCR	
	<400> 32	
5	ccgatggatg atctgttaga ggcgg	25
	<210> 33	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
15	<400> 33	
	ggcaattacc ctgcacgtac cgg	23
	<210> 34	
20	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> cebador de PCR	
	<400> 34	
	ccgcctctaa cagatcatcc atcgg	25
30	<210> 35	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador específico	
	<400> 35	
40	gaaactcgcc gtttatagca caaaacagta cgacaagaag tacctgcaac aggtgaacga	60
	gtcctttggc ttgagctgg tgtaggctgg agctgctcg	100
	<210> 36	
45	<211> 101	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> cebador específico	
	<400> 36	
	ttaaaccagt tcgttcgggc aggttcgcc ttttccaga tgcttaagt ttgcagcgt	60
55	agtctgagaa atactggtca gcatatgaat atcctccta g	101
	<210> 37	
	<211> 100	
	<212> ADN	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
65	<400> 37	

ES 2 550 361 T3

	atgaacaact ttaatctgca caccccaacc cgattctgt ttgtaaagg cgcaatcgct ggtttacgcg aacaaattcc tgtaggctgg agctgcttcg	60 100
5	<210> 38 <211> 101 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador específico <400> 38	
15	ttagcgggcg gcttcgtata tacggcggct gacatccaac gtaatgcat gatttcgcc cagttgggct atgccgtgct ccatatgaat atcctccta g	60 101
20	<210> 39 <211> 99 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador específico <400> 39	
30	atggctatcc ctgcatttgg ttaggtact ttccgtctga aagacgacgt tgtatttca tctgtgataa cgcgcttgt gtaggctgga gctgcttcg	60 99
35	<210> 40 <211> 100 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador específico <400> 40	
45	tcccattcag gagccagacc ttccgggcta accagggcgt cgttgcaatc cagtcggcg atcgctttt tatcttcggc catatgaata tcctccttag	60 100
50	<210> 41 <211> 101 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador específico <400> 41	
60	ttacggtacg tcgtaccca gtccgcttt acggatacga aaccattgtt gacgggtcat ttcagtggt tctgcttca ctgtaggctg gagctgctc g	60 101
65	<210> 42 <211> 101 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador específico <400> 42	
	atgggtcagc gtattactat tgcgccgcaa ggccccggagt ttcccggtt tgtgatgggc	60

	tactggcgat tgatggactg gcatatgaat atcctccta g	101
	<210> 43	
	<211> 101	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
10	<400> 43	
	atgagaataa atttcgcaca acgctttcg ggagtcagta tggatatcat cttttatcac	60
15	ccaacgttcg atacccaatg gtgtaggctg gagctgctc g	101
	<210> 44	
	<211> 99	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador específico	
	<400> 44	
25	ttagtagccg cgtgcgcggt cgactgccc gcagaccctc tcccctttt cgagctgggc	60
	aatggtgcga gaaatgtacc atatgaatat cctccttag	99
	<210> 45	
30	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> cebador específico	
	<400> 45	
	agtcatatat tccaccagct atttgtagt gaataaaagc cacacattat tcgagccgga	60
40	tgattaatag tcaacagctc tgtaggctgg agctgctcg	100
	<210> 46	
	<211> 79	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
50	<400> 46	
	gctcacatta cgtgactgat tctaacaaaa cattaacacc aactggcaaa attttgtccc	60
	atatgaatat cctccttag	79
55	<210> 47	
	<211> 102	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 47	
65	cgcgcgagac tcgctctgct tatctcgccc ggatagaaca agcgaaaact tcgaccgttc	60
	atcgttcgca gttggcatgc ggtgtaggct ggagctgctt cg	102

5	<210> 48 <211> 100 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador de PCR	
10	<400> 48 gcttagcgcc ttctacagct tcacgcgcca gcttagtaat gcggtcgtaa tcgcccgtt ccagcgcac tgccggaacc catatgaata tcctccttag	60 100
15	<210> 49 <211> 101 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador específico <400> 49	
25	atgcgtcttc tcataccat gctgcgcgtt ggcgattgc aacgtccat cgattttat accaaagtgc tgggcatgaa gtgtaggctg gagctgcttc g	60 101
30	<210> 50 <211> 100 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador específico	
35	<400> 50 ttagttgccc agaccgcgac cggcgtcttt ctctcgatt aactcaattt tgtaaccgtc cggatcttc acaaacgcga catatgaata tcctccttag	60 100
40	<210> 51 <211> 101 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador de PCR <400> 51	
50	cgcggcgggt gccaacgttg tacgtatgaa ctttctcac ggctcgctg aagatcacia aatgcgcgcg gataaagttc gtgtaggctg gagctgcttc g	60 101
55	<210> 52 <211> 101 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador de PCR <400> 52	
65	cgccgcatcc ggcaacgtac ttactctacc gttaaaatac gcgtggatt agtagaacc acggtactca tcacgtgcc ccatatgaat atcctccta g	60 101

ES 2 550 361 T3

	<210> 53	
	<211> 101	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 53	
10	cgcgggcgggt gccaacgttg tacgtatgaa ctttctcac ggctcgctg aagatcaca	60
	aatgcgcgcg gataaagttc gtgtaggctg gagctgcttc g	101
	<210> 54	
15	<211> 101	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> cebador de PCR	
	<400> 54	
	cgccgcatcc ggcaacgtac ttactctacc gttaaatac gcgtggatt agtagaaccc	60
25	acgggtactca tcacgtcgcc ccatatgaat atcctccta g	101
	<210> 55	
	<211> 24	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
35	<400> 55	
	ccgacagtaa gacgggtaag cctg	24
	<210> 56	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> cebador específico	
	<400> 56	
	agcttagtaa agccctcgct ag	22
50	<210> 57	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador específico	
	<400> 57	
60	catgggctag ctacgtatta attaaagatc tcctagggag ctaccgggt aaaaataaga	60
	gttaccttaa atggaactc ttatTTTTT aggcgcgcca	100
	<210> 58	
65	<211> 100	
	<212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
5	<400> 58	
	agcttggcgc gcctaaaaa ataagagta ccatttaagg taactcttat tttaaccgg	60
10	tgagctccct aggagatctt taattaatac gtagctagcc	100
	<210> 59	
	<211> 79	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador específico	
	<400> 59	
20	ctagctagcg gcgtaaaaag ctagcgggc ggcttcgtat atacggcggc tgacatccaa	60
	cgtaatgtcg tgatttcg	79
	<210> 60	
25	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> cebador específico	
	<400> 60	
	cgatgcacgt catgaacaac ttaatctgc acacccaac ccg	43
35	<210> 61	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador específico	
	<400> 61	
45	cgtacgtact gtaggaaagt taactacgg	29
	<210> 62	
	<211> 29	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
55	<400> 62	
	gaagatcttt acttcagacg gtccgcgag	29
60	<210> 63	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> cebador específico	

	<400> 63	
5	gacctaggct ctaaaggagc aattatgg	28
	<210> 64	
	<211> 26	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador específico	
	<400> 64	
15	cgagctctta ttccactct tgcagg	26
	<210> 65	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
25	<400> 65	
	catgccatgg ctatccctgc atttggtta	30
30	<210> 66	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 66	
40	ctagctagct taatccatt caggagccag	30
	<210> 67	
	<211> 31	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
50	<400> 67	
	catgccatgg ctaatccaac cgttattaag c	31
	<210> 68	
55	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> cebador de PCR	
	<400> 68	
	ctagctagct tagccgccga actggtcagg	30
65	<210> 69	

	<211> 41		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Promotor sintético		
	<400> 69		
10	gagctgttga cgattaatca tccggctcga ataattgtg g	41	
	<210> 70		
	<211> 65		
	<212> ADN		
15	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador de PCR		
20	<400> 70		
	ccttttattc actaacaat agctgggtgga atatattgcc aacaatggct cgtcaccgct	60	
	ggtgc 65		
25	<210> 71		
	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> cebador de PCR		
	<400> 71		
35	aatcgcaagc tgaatccgg ttattcttc agttcagcca ggc	43	43
	<210> 72		
	<211> 65		
	<212> ADN		
40	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador de PCR		
45	<400> 72		
	gcaccagcgg tgacgagcca ttgttgaca tatattccac cagctatttg ttagtgaata	60	
	aaagg 65		
50	<210> 73		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> cebador de PCR		
	<400> 73		
60	acgtcccggg caagcccaaa ggaagagtga ggc	33	

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar 1,2-propanodiol en el que una *Escherichia coli* modificada, útil para la producción del 1,2-propanodiol, caracterizada por que presenta:

- una actividad de metil glioxal reductasa aumentada, obtenida mediante la sobreexpresión del gen *yqhD* a partir de *Escherichia coli*,
 - la eliminación de por lo menos uno de los genes *edd*, *eda* implicados en la ruta de Entner-Doudoroff,
- se hace crecer en un medio de crecimiento adecuado que contiene una fuente de carbono, y el 1,2-propanodiol producido es recuperado.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en dicha *E. coli* modificada, se obtiene la sobreexpresión sustituyendo el promotor natural del gen *yqhD* implicado en la reducción de metil glioxal con un promotor que induce un nivel más potente de expresión de por lo menos uno de dicho gen, o introduciendo copias múltiples del gen *yqhD* implicado en la reducción de metil glioxal en el interior del microorganismo.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que en dicha *E. coli* modificada, es aumentada la actividad de metil glioxal sintasa mediante la sobreexpresión del gen *mgsA* o mediante una mutación específica introducida en el interior del gen *mgsA*.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en dicha *E. coli* modificada, es atenuada la expresión de por lo menos uno de los genes siguientes implicados en la conversión del metilglioxal en lactato: *gloA*, *aldA*, *aldB*.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que en dicha *E. coli* modificada, es atenuada la expresión de por lo menos uno de los genes siguientes implicados en la síntesis de lactato, formato o etanol: *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en dicha *E. coli* modificada, es atenuada la expresión de por lo menos uno de los genes siguientes implicados en la síntesis del acetato: *ackA*, *pta*, *poxB*.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que en dicha *E. coli* modificada, es atenuada la actividad de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa atenuando la expresión del gen *gapA*.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que en dicha *E. coli* modificada, es aumentada la eficacia de la importación de azúcar aumentando la expresión de por lo menos un gen implicado en un sistema de importación de azúcar independiente del fosfoenolpiruvato y seleccionado de entre *galP* y *glk*.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que en dicha *E. coli* modificada, es mejorada la eficacia del sistema azúcar-fosfotransferasa aumentando la disponibilidad del metabolito fosfoenolpiruvato, en el que:

- es atenuada la expresión de por lo menos un gen que codifica la enzima piruvato cinasa y seleccionado de entre *pykA* y *pykF* y/o,
- es aumentada la expresión del gen *ppsA* que codifica la fosfoenolpiruvato sintasa.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que en dicha *E. coli* modificada:

- es aumentada la actividad de glicerol deshidrogenasa aumentando la expresión del gen *gldA* y/o,
- es aumentada la actividad de 1,2-propanodiol oxidorreductasa aumentando la expresión del gen *fucO*.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que en dicha *E. coli* modificada, el gen *lpd* presenta una mutación puntual que conduce a una sustitución de la alanina 55 por la valina.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que en dicha *E. coli* modificada:

- la actividad de triosa fosfato isomerasa es atenuada atenuando la expresión del gen *tpiA* y/o,
- la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre *arcA* y *ndh* es atenuada.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el 1,2-propanodiol recuperado es además purificado.

14. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 13, en el que el acetol es recuperado y purificado.

15. *E. coli* modificada útil para la producción de 1,2-propanodiol y/o acetol a partir de una fuente de carbono, en la que dicha cepa está caracterizada por que presenta:

- 5 - un actividad de metil glioxal reductasa aumentada, obtenida a partir de la sobreexpresión del gen *yqhD* de *Escherichia coli*,
- 10 - un actividad de metilglioxal sintasa aumentada, obtenida mediante la sobreexpresión del gen *mgsA*, y
- la eliminación de por lo menos uno de los genes *edd*, *eda* implicados en la ruta de Entner-Doudoroff.

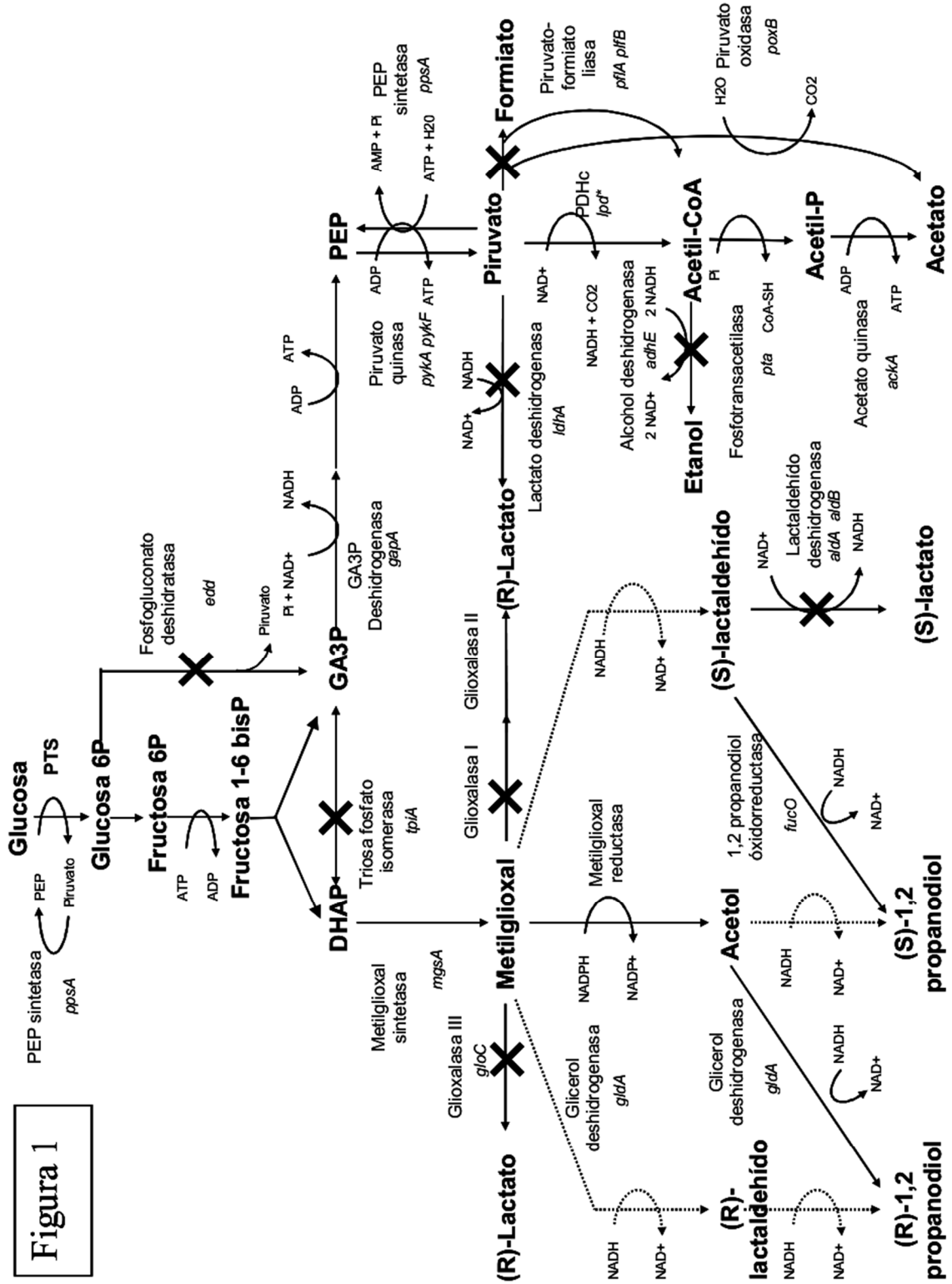


Fig. 2

