

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 814**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/32** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12P 5/02** (2006.01)

**C12N 9/88** (2006.01)

**C12P 7/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2012 E 12743917 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2732031**

54 Título: **Microorganismo recombinante para la producción de metabolitos útiles**

30 Prioridad:

**12.07.2011 EP 11173563**

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

**23.12.2015**

73 Titular/es:

**SCIENTIST OF FORTUNE S.A. (100.0%)  
7a rue des Glacis  
1628 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**MARLIERE, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 554 814 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).

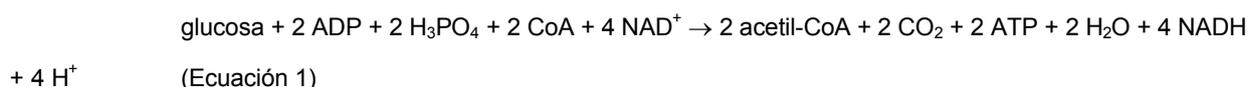
## DESCRIPCIÓN

Microorganismo recombinante para la producción de metabolitos útiles

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante caracterizado por tener actividad de fosfocetolasa, por tener una ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican la fosfofructoquinasa o que se modifican genéticamente para reducir la actividad de fosfofructoquinasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente o que no posee actividad de fosfofructoquinasa y que tiene una rama oxidativa disminuida o inactiva de la ruta del fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifican la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o que se modifica genéticamente para reducir la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente o que no posee actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Dicho microorganismo se puede usar para la producción de metabolitos útiles tales como acetona, isobuteno o propeno.

Desde hace varias décadas, los practicantes de la ingeniería del metabolismo se han esforzado en proporcionar soluciones biológicas para la producción de productos químicos, proporcionando, por lo tanto, alternativas a los procedimientos químicos más tradicionales. En general, las soluciones biológicas permiten el uso de materiales de abastecimiento renovables (por ejemplo azúcares) y compiten con los procedimientos existentes basados en materiales petroquímicos. Una solución biológica, de múltiples etapas para la producción de un producto químico por lo general comprende un microorganismo como el catalizador para la conversión del material de abastecimiento a una molécula diana. Un conjunto completo de reacciones enzimáticas para la producción de una molécula diana en particular se puede agrupar en aquellas que pertenecen a rutas de carbono central y aquellas que pertenecen a la ruta específica de producto. Las reacciones que pertenecen a la ruta de carbono central y la ruta específica de producto están relacionadas en el sentido que las restricciones de redox (por lo general, NAD(P)H) y energéticas (por lo general, ATP) de todas y cada una de las reacciones enzimáticas se deben tener en cuenta en un balance general que contribuye a la competitividad del procedimiento. Históricamente, las rutas de carbono central de los heterótrofos que crecen en azúcares se han descrito como la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMPP), la ruta del fosfato de pentosa (PPP), la ruta Entner-Doudoroff (EDP), y la ruta de fosfocetolasa (PKP) (véase Gottschalk (1986), *Bacterial Metabolism*, 2ª Edición, Springer-Verlag, New York). Cada ruta central o combinaciones de rutas centrales ofrecen ventajas y desventajas con respecto a una molécula diana específica. Con el fin de proporcionar bioprocesos competitivos, se han descrito microorganismos recombinantes con modificaciones que implican las EMPP, PPP y EDP (M. Emmerling y col., *Metab. Eng.* 1:117 (1999); L. O. Ingram y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2420 (1987); C. T. Trinh y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3634 (2008)). Más recientemente, se han descrito microorganismos recombinantes con modificaciones que implican la PKP (véase Sonderegger y col. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004), 2892-2897, documento de Patente US 7.253.001, Chinen y col. *J. Biosci. Bioeng.* 103 (2007), 262-269, documento de Patente US 7.785.858; Fleige y col., *Appl. Microbiol. Cell Physiol.* 91 (2011), 769-776).

La EMPP convierte 1 mol de glucosa en 2 moles de piruvato (PYR). Cuando se desea acetyl-CoA, 1 mol de PYR se puede convertir en 1 mol de acetyl-CoA con la generación simultánea de 1 mol de CO<sub>2</sub> y 1 mol de NADH. La suma de las reacciones se da en la ecuación 1.



La PPP proporciona un medio para convertir 1 mol de glucosa en 1 mol de CO<sub>2</sub> y 2 moles de NADPH, con la generación simultánea de 0,67 moles de fructosa-6-fosfato (F6P) y 0,33 moles de gliceraldehído-3-fosfato (GAP). El F6P y GAP formados de esta manera se deben metabolizar por otras rutas de reacción, por ejemplo por la EMPP. La EDP convierte 1 mol de glucosa en 1 mol de GAP y 1 mol de PYR con la generación simultánea de 1 mol de NADPH. Al igual que con la PPP, el GAP formado de esta manera se debe metabolizar por otras rutas de reacción. La PKP proporciona un medio para convertir 1 mol de glucosa en 1 mol de GAP y 1,5 moles de fosfato de acetyl (AcP). Cuando se desea acetyl-CoA, 1 equivalente de AcP más 1 equivalente de coenzima A (CoA) se puede convertir en 1 equivalente de acetyl-CoA y 1 equivalente de fosfato inorgánico (Pi) por la acción de la fosfotransacetilasa.

Para moléculas diana específicas derivadas de restos de AcCoA generados a través de la PKP y casi neutralidad redox para los restos AcCoA, existe una deficiencia en el balance de energía global. La PKP (y, de manera similar, la PPP y la EDP) no genera ATP para la conversión de glucosa en glucosa-6-fosfato. En el caso de la absorción de glucosa dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP), el PEP se debe generar por otros medios, por ejemplo a través de la EMPP. El reciclado del GAP a través de la PKP exacerba el problema, particularmente cuando la ruta específica de producto proporciona poco ATP. Sonderegger (mencionado anteriormente) y el documento de Patente US 7.253.001 describen cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* que comprenden actividad de fosfocetolasa nativa o sobreexpresada junto con la fosfotransacetilasa sobreexpresada para incrementar el rendimiento en la conversión de mezclas de glucosa/xilosa en etanol. Estas cepas presentan absorción de glucosa independiente de PEP en la que tanto la EMPP como la PPP son operativas.

Chinen (mencionado anteriormente) y el documento de Patente US 7.785.858 desvelan una bacteria recombinante seleccionada entre el grupo que consiste de la familia Enterobacteriaceae, la bacteria Coryneform, y la bacteria Bacillus que comprende actividad incrementada de fosfocetolasa para la conversión de glucosa hasta las moléculas diana las cuales se producen a través de la acetil-CoA intermediaria, incluyendo el grupo que consiste de ácido L-glutámico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, L-cisteína, succinato y polihidroxibutirato. Estas cepas presentan absorción de glucosa dependiente de PEP con la EMPP operativa. De manera notable, la actividad de fosfofructoquinasa en la bacteria de la documento de Patente US 7.785.858 está reducida en comparación con la de una cepa de tipo silvestre o sin modificar (véase la página 33).

El que un microorganismo en particular use absorción de glucosa independiente de PEP o absorción de glucosa dependiente de PEP influye en el balance energético global de un procedimiento. Por ejemplo, las cepas de *S. cerevisiae* usan de manera natural la absorción de glucosa independiente de PEP mientras que las cepas de *Escherichia coli* usan de manera natural la absorción de glucosa dependiente de PEP. Se han descrito cepas de *E. coli* en las que la absorción de glucosa dependiente de PEP se ha sustituido con absorción de glucosa independiente de PEP. Flores y col. (Metabolic Engineering (2005) 7, 70-87) y documento de Patente US 7.371.558. En particular, el documento de Patente US 7.371.558 describe la modificación de la absorción de glucosa para incrementar el rendimiento en la conversión de glucosa a 1,3-propanodiol. Las cepas presentan absorción de glucosa independiente de PEP en la que tanto la EMPP como la PPP son operativas, de manera notable sin actividad de fosfocetolasa presente.

Existe la necesidad de desarrollar microorganismos recombinantes, que comprendan rutas de carbono central y rutas específicas de producto que lleven al máximo la conversión de material de abastecimiento hasta producto acomodando de manera adecuada las restricciones redox y energéticas de las reacciones de las enzimas. Los solicitantes han resuelto esta necesidad proporcionando las realizaciones como se definen en las reivindicaciones.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un microorganismo recombinante caracterizado porque:

- a) tiene actividad de fosfocetolasa;
- b) (i) tiene una ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican la fosfofructoquinasa o porque se modifican genéticamente para reducir la actividad de fosfofructoquinasa en comparación con un microorganismo no modificado; o
- (ii) no poseen actividad de fosfofructoquinasa
- y
- c) (i) tienen una rama oxidativa disminuida o inactivada de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifican la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o porque se modifican genéticamente para reducir la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado; o
- (ii) no poseen actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

El microorganismo de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque tiene actividad de fosfocetolasa, para incrementar el flujo de acetil-CoA producida. Usualmente, un microorganismo convierte la glucosa a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas en piruvato el cual después se puede convertir en acetil-CoA por la enzima piruvato deshidrogenasa. Sin embargo, esta conversión está acompañada por la liberación de CO<sub>2</sub> y, por lo tanto, se pierde un átomo de carbono que se podría haber usado en la producción de metabolitos útiles. Con el fin de incrementar la cantidad de acetil-CoA en un microorganismo es por lo tanto deseable que la acetil-CoA se forme a través de una ruta diferente para evitar la pérdida de átomos de carbono. Mediante el uso de un microorganismo que tiene actividad de fosfocetolasa, el fosfato y la fructosa-6-fosfato se convierten en eritrosa-4-fosfato y fosfato de acetilo y la fosfotransacetilasa convierte posteriormente el fosfato de acetilo en acetil-CoA sin pérdida de un átomo de carbono. Por lo tanto, al final, el rendimiento de acetil-CoA se puede incrementar usando un microorganismo que tenga actividad de fosfocetolasa. Dicho microorganismo es capaz de convertir la glucosa en acetil-CoA sin pérdida de un átomo de carbono. Los microorganismos recombinantes en los que una fosfocetolasa se expresa de forma natural o de forma heteróloga se describen en los documentos de patente US 7.785.858 y US 7.253.001.

La expresión "actividad de fosfocetolasa" tal como se usa en la presente invención significa una actividad enzimática que es capaz de convertir D-xilulosa-5-fosfato en D-gliceraldehído-3-fosfato de acuerdo con la siguiente reacción:



o que es capaz de catalizar la reacción mostrada anteriormente y que también es capaz de convertir D-fructosa-6-fosfato en D-eritrosa-4-fosfato de acuerdo con la siguiente reacción:



Las primeras fosfocetolasas usualmente se clasifican en EC 4.1.2.9 y las últimas en EC 4.1.2.22. Ambos tipos de fosfocetolasas se pueden usar en el alcance de la presente invención. La Figura 1 muestra esquemas para las reacciones generales usando las dos opciones de la fosfocetolasa como se describe en el presente documento.

Esta actividad enzimática se puede medir usando ensayos conocidos en la técnica. Un ejemplo para dicho ensayo se da en la sección de Ejemplos más adelante.

5 En el contexto de la presente invención, un microorganismo que tiene actividad de fosfocetolasa puede ser, por ejemplo, un microorganismo el cual de manera natural tiene actividad de fosfocetolasa o un microorganismo que de manera natural no tiene actividad de fosfocetolasa y que se ha modificado genéticamente para que exprese una fosfocetolasa o un microorganismo que de manera natural tiene actividad de fosfocetolasa y el cual se ha modificado genéticamente, por ejemplo transformado con un ácido nucleico, por ejemplo un vector, que codifica una fosfocetolasa con el fin de incrementar la actividad de fosfocetolasa en dicho microorganismo.

10 Los microorganismos que de manera inherente, es decir de manera natural, tienen actividad de fosfocetolasa se conocen en la técnica y se puede usar cualquiera de los mismos en el contexto de la presente invención.

15 También es posible en el contexto de la presente invención que el microorganismo sea un microorganismo que de manera natural no tiene actividad de fosfocetolasa pero que se modifica genéticamente para que comprenda una secuencia de nucleótido que permita la expresión de una fosfocetolasa. De manera similar, el microorganismo también puede ser un microorganismo que de manera natural tiene actividad de fosfocetolasa pero que se modifica genéticamente para incrementar la actividad de fosfocetolasa, por ejemplo mediante la introducción de una secuencia de nucleótido exógena que codifica una fosfocetolasa.

La modificación genética de microorganismos para expresar una enzima de interés se describe con mayor detalle más adelante.

20 La fosfocetolasa expresada en el microorganismo de acuerdo con la invención puede ser cualquier fosfocetolasa, en particular una fosfocetolasa proveniente de organismos procariotas o eucariotas. Las fosfocetolasas procariotas se describen, por ejemplo, de *Lactococcus lactis* y se da un ejemplo en la sección de Ejemplos.

25 En una realización preferente de la presente invención la fosfocetolasa es una enzima que comprende una secuencia de aminoácido como la codificada por SQ0005 mostrada en la sección de Ejemplos o una secuencia que es por lo menos "n" % idéntica a dicha secuencia de aminoácido y que tiene la actividad de una fosfocetolasa en la que "n" es un número entero entre 10 y 100, preferentemente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99.

30 Preferentemente, el grado de identidad se determina comparando la secuencia respectiva con la secuencia de aminoácido de cualquiera de las SEC ID N<sup>o</sup>s mencionadas anteriormente. Cuando las secuencias que se comparan no tienen la misma longitud, el grado de identidad se refiere preferentemente ya sea al porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia más corta que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia más larga o al porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia más larga que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia más corta. El grado de identidad de secuencia se puede determinar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica usando preferentemente algoritmos informáticos apropiados tales como CLUSTAL.

35 Cuando se usa el procedimiento de análisis Clustal para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 80 % idéntica a una secuencia de referencia se pueden usar parámetros predeterminados o los parámetros preferentemente son los siguientes: Matriz: blosum 30; Penalización por espacio abierto: 10,0; Penalización por espacio extendido: 0,05; divergente de retraso: 40; distancia de separación de espacio: 8 para comparaciones de secuencias de aminoácido. Para comparaciones de secuencia de nucleótido, la Penalización por espacio extendido preferentemente se ajusta a 5,0.

40 Preferentemente, el grado de identidad se calcula a través de la longitud completa de la secuencia.

La fosfocetolasa expresada en el microorganismo de acuerdo con la invención puede ser una fosfocetolasa que ocurra de manera natural o ésta puede ser una fosfocetolasa que se obtiene a partir de una fosfocetolasa que ocurre de manera natural, por ejemplo mediante la introducción de mutaciones u otras alteraciones las cuales, por ejemplo, alteran o mejoran la actividad enzimática, la estabilidad, etc.

45 Los procedimientos para modificar y/o mejorar las actividades enzimáticas deseadas de proteínas son bien conocidos para el experto en la materia e incluyen, por ejemplo, mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida a sitio y la selección posterior de enzimas que tienen las propiedades deseadas o estrategias de la denominada "evolución dirigida".

50 Por ejemplo, para modificación genética en células procariotas, se puede introducir una molécula de ácido nucleico que codifica la fosfocetolasa en plásmidos que permiten la mutagénesis o modificación de secuencia mediante recombinación de secuencias de ADN. Los procedimientos convencionales (véase Sambrook y Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.) permiten que se efectúen intercambios de base o que se puedan agregar secuencias naturales o sintéticas. Los fragmentos de ADN se pueden ligar usando adaptadores y enlazadores complementarios a los fragmentos. Asimismo, se pueden usar medidas de ingeniería que proporcionen sitios de restricción apropiados o que eliminen ADN o sitios de restricción sobrantes. En aquellos casos, en los que son posibles inserciones, supresiones o sustituciones, se puede usar

mutagénesis *in vitro*, "reparación de cebador", restricción o ligación. En general, como procedimientos de análisis se realizan un análisis de secuencia, análisis de restricción y otros procedimientos de bioquímica y biología molecular. Las variantes de fosfoacetolasa resultantes después se evalúan respecto a la actividad deseada, por ejemplo, actividad enzimática, con un ensayo como el descrito anteriormente y en particular respecto a sus actividades de enzima incrementadas.

Como se describió anteriormente, el microorganismo de la invención puede ser un microorganismo que se ha modificado genéticamente mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica una fosfoacetolasa. Por lo tanto, en una realización preferente, el microorganismo recombinante es un microorganismo recombinante que se ha modificado genéticamente para que tenga una actividad incrementada de fosfoacetolasa. Esto se puede lograr por ejemplo transformando el microorganismo con un ácido nucleico que codifica una fosfoacetolasa. Más adelante se proporciona una descripción detallada de la modificación genética de microorganismos. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico introducida dentro del microorganismo es una molécula de ácido nucleico que es heteróloga con respecto al microorganismo, es decir ésta no ocurre de manera natural en dicho microorganismo.

En el contexto de la presente invención, una "actividad incrementada" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular de la fosfoacetolasa en el microorganismo modificado genéticamente es por lo menos un 10 %, preferentemente por lo menos un 20 %, de manera más preferente por lo menos un 30 % o un 50 %, de manera incluso más preferente por lo menos un 70 % o un 80 % y particularmente preferente por lo menos un 90 % o un 100 % más alta que en el microorganismo no modificado correspondiente. En realizaciones incluso más preferentes el incremento en la expresión y/o actividad puede ser por lo menos un 150 %, por lo menos un 200 % o por lo menos un 500 %. En realizaciones particularmente preferentes la expresión es por lo menos 10 veces, de manera más preferente por lo menos 100 veces e incluso más preferente por lo menos 1000 veces más alta que en el microorganismo no modificado correspondiente.

El término expresión/actividad "incrementada" también cubre la situación en la que el microorganismo no modificado correspondiente no expresa una enzima correspondiente, por ejemplo fosfoacetolasa, de modo tal que la expresión/actividad correspondiente en el microorganismo no modificado es cero.

Los procedimientos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula son bien conocidos por el experto en la materia. En una realización, la medición del nivel de expresión se hace midiendo la cantidad de la proteína correspondiente. Los procedimientos correspondientes son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen Western Blot, ELISA etc. En otra realización la medición del nivel de expresión se hace midiendo la cantidad del ARN correspondiente. Los procedimientos correspondientes son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen, por ejemplo, Northern Blot.

Los procedimientos para medir la actividad enzimática de la fosfoacetolasa se conocen en la técnica y ya se describieron anteriormente.

El microorganismo de acuerdo con la presente invención también se caracteriza por tener una ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican una fosfofructoquinasa o por reducción de la actividad de fosfofructoquinasa en comparación con un microorganismo no modificado o por no poseer actividad de fosfofructoquinasa. Por lo tanto, el microorganismo es cualquiera de un microorganismo que de manera natural tiene una EMPP que incluye actividad de fosfofructoquinasa pero que se ha modificado genéticamente de modo que la actividad de fosfofructoquinasa se elimine ya sea completamente o de modo que ésta se reduzca en comparación con el microorganismo no modificado genéticamente correspondiente, o el microorganismo es un microorganismo que de manera natural no posee una actividad de fosfofructoquinasa.

Como ya se mencionó anteriormente, cuando la glucosa se procesa a través de la EMPP hasta acetil-CoA, se pierde un átomo de carbono por la liberación de CO<sub>2</sub> en la última etapa. Esta pérdida se puede evitar mediante la introducción de la fosfoacetolasa. Debido a que la fructosa-6-fosfato es un sustrato para la fosfoacetolasa, es deseable que la reserva de fructosa-6-fosfato se mantenga a un nivel alto en el microorganismo con el fin de incrementar el rendimiento en acetil-CoA. Debido a que la fructosa-6-fosfato también es un sustrato para una enzima de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, es decir la fosfofructoquinasa, el microorganismo recombinante de la presente invención tiene una actividad reducida de fosfofructoquinasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente o el gen o genes que codifican una fosfofructoquinasa se han inactivado. Esto asegura que el flujo de fructosa-6-fosfato se dirija a la fosfoacetolasa y a la producción de acetil-CoA sin pérdida de CO<sub>2</sub> debido a que la fructosa-6-fosfato o la mayoría de fructosa-6-fosfato ya no se puede procesar a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas. Los microorganismos recombinantes en los que una fosfoacetolasa se expresa en forma natural o en forma heteróloga y los cuales tienen actividad reducida de fosfofructoquinasa se desvelan en el documento de patente US 7.785.858.

La "actividad de fosfofructoquinasa" significa una actividad enzimática que convierte el ATP y la fructosa-6-fosfato en ADP y fructosa-1,6-bisfosfato (EC 2.7.1.11). Esta actividad enzimática se puede medir usando ensayos conocidos en la técnica como se describe, por ejemplo, por Kotlarz y col. (Methods Enzymol. (1982) 90, 60-70).

La expresión "un microorganismo que se caracteriza por tener una ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican una fosfofructoquinasa o mediante modificación genética para reducir la actividad de fosfofructoquinasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente" se refiere a un microorganismo en el que la inactivación del gen o genes que codifican una fosfofructoquinasa o la reducción de la actividad de fosfofructoquinasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente se logra mediante una modificación genética del microorganismo que lleva a dicha inactivación o reducción.

En una realización preferente, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene una ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) inactivada por inactivación del gen o genes que codifican una fosfofructoquinasa. La inactivación del gen o genes que codifican una fosfofructoquinasa en el contexto de la presente invención significa que el gen o genes que codifican fosfofructoquinasa que están presentes en el microorganismo están inactivados de modo tal que éstos ya no se expresan y/o ya no llevan a la síntesis de fosfofructoquinasa funcional. La inactivación se puede lograr mediante muchas maneras diferentes conocidas en la técnica. La inactivación se puede lograr, por ejemplo, mediante la alteración del gen o genes que codifican la fosfofructoquinasa o mediante supresión limpia de dicho(s) gen(es) a través de la introducción de un marcador de selección. De manera alternativa, el promotor del gen o genes que codifican la fosfofructoquinasa se puede mutar en una manera en la que el gen ya no se transcriba como ARNm. Otras maneras para inactivar el gen o genes que codifican la fosfofructoquinasa conocidas en la técnica son: expresar un polinucleótido que codifica ARN que tiene una secuencia de nucleótido complementaria al transcrito del gen o genes de fosfofructoquinasa de modo tal que el ARNm ya no se pueda traducir como una proteína; expresar un polinucleótido que codifica ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de ARNi; expresar un polinucleótido que codifica ARN que tenga una actividad de cortar específicamente un transcrito de dicho gen o genes; o expresar un polinucleótido que codifica ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de co-supresión. Estos polinucleótidos se pueden incorporar en un vector, el cual se puede introducir dentro del microorganismo mediante transformación para lograr la inactivación del gen o genes que codifican la fosfofructoquinasa.

El término "inactivación" en el contexto de la presente invención significa preferentemente inactivación completa, es decir que el microorganismo no muestra actividad de fosfofructoquinasa. Esto significa en particular que el microorganismo no muestra actividad de fosfofructoquinasa independiente de las condiciones de crecimiento usadas. Preferentemente, "inactivación" significa que el gen o genes que codifican fosfofructoquinasa que están presentes en el microorganismo están modificados genéticamente para evitar la expresión de la enzima. Esto se puede lograr, por ejemplo mediante supresión del gen o partes del mismo en la que la supresión de las partes del mismo evita la expresión de la enzima, o mediante alteración del gen ya sea en la región codificadora o en la región de promotor en la que la alteración tiene el efecto de que no se exprese proteína o que se exprese una proteína disfuncional.

En una realización preferente, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene una ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida por reducción de la actividad de fosfofructoquinasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente. Esta reducción se logra mediante una modificación genética del microorganismo. Esto se puede lograr por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida a sitio del promotor y/o la enzima y selección posterior de los promotores y/o enzimas que tienen las propiedades deseadas o mediante secuencias de nucleótido complementarias o efecto de ARNi como se describió anteriormente. Más adelante se proporciona una descripción detallada de la modificación genética de microorganismos.

En el contexto de la presente invención, una "actividad reducida" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular de la fosfofructoquinasa, en el microorganismo modificado genéticamente es por lo menos un 10 %, preferentemente por lo menos un 20 %, de manera más preferente por lo menos un 30 % o un 50 %, de manera incluso más preferente por lo menos un 70 % o un 80 % y particularmente preferente por lo menos un 90 % o un 100 % más baja que en el microorganismo no modificado correspondiente. Algunos procedimientos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula son bien conocidos por el experto en la materia. En la técnica se conocen ensayos para medir la actividad enzimática reducida de una fosfofructoquinasa.

En otra realización el microorganismo de acuerdo con la presente invención es un microorganismo que no posee una actividad de fosfofructoquinasa. Esto significa preferentemente que dicho microorganismo no posee de manera natural una actividad de fosfofructoquinasa. Esto significa que dicho microorganismo no contiene de manera natural en su genoma una secuencia de nucleótido que codifica una enzima con actividad de fosfofructoquinasa. Algunos ejemplos para dichos microorganismos son *Zymomonas mobilis* (J. S. Suo y col., Nat. Biotechnol. 23: 63 (2005)) y *Ralstonia eutropha* (C. Fleige y col., Appl. Microb. Cell Physiol. 91: 769 (2011)).

El microorganismo de acuerdo con la presente invención también se caracteriza por tener una rama oxidativa disminuida o inactivada de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifican una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o por reducción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente o por no poseer actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Por lo tanto, el microorganismo es cualquiera de un microorganismo que de manera natural tiene una PPP que incluye actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa pero que se ha modificado genéticamente de modo que la actividad

de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se elimina ya sea completamente o de modo tal que esta se reduce en comparación con el microorganismo no modificado genéticamente correspondiente, o el microorganismo es un microorganismo que de manera natural no posee una actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

5 La disminución o inactivación de la rama oxidativa de la ruta de fosfato de pentosa incrementa adicionalmente el rendimiento en acetil-CoA debido a que la glucosa-6-fosfato ya no se extraerá a través del ciclo de fosfato de pentosa. Toda o casi toda la glucosa-6-fosfato en el microorganismo se convertirá en fructosa-6-fosfato la cual después se convertirá adicionalmente en acetil-CoA.

10 La "actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa" significa una actividad enzimática que convierte glucosa-6-fosfato y  $\text{NADP}^+$  en 6-fosfoglucono- $\delta$ -lactona y NADPH (EC 1.1.1.49). Esta actividad enzimática se puede medir usando ensayos conocidos en la técnica como se describe, por ejemplo, en Noltmann y col. (J. Biol. Chem. (1961) 236, 1225-1230).

15 La expresión "un microorganismo que se caracteriza por tener una rama oxidativa disminuida o inactivada de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifican una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o que se modifican genéticamente para reducir la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente" se refiere a un microorganismo en el que la inactivación del gen o genes que codifican una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o la reducción de la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente se logra mediante una modificación genética del microorganismo que lleva a dicha inactivación o reducción.

20 En una realización preferente, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene una rama oxidativa inactivada de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifican una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La inactivación del gen o genes que codifican una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en el contexto de la presente invención significa que el gen o genes que codifican una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que está (están) presente(s) en el microorganismo está (están) inactivados de modo tal que éstos ya no se expresan y/o ya no llevan a la síntesis de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa funcional.  
25 La inactivación se puede lograr mediante muchas maneras diferentes conocidas en la técnica. La inactivación se puede lograr, por ejemplo, mediante la alteración del gen o genes que codifican la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o mediante supresión limpia de dicho gen o genes a través de la introducción de un marcador de selección. De manera alternativa, el promotor del gen o genes que codifican la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se puede(n) mutar en una manera que el gen o genes ya no se transcriba(n) como ARNm. Otras maneras para inactivar el gen o genes que codifican la fosfofructoquinasa conocidas en la técnica son: expresar un polinucleótido que codifica ARN que tiene una secuencia de nucleótido complementaria al transcrito del gen o genes de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de modo tal que el ARNm ya no se puede traducir como una proteína, expresar un polinucleótido que codifica ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de ARNi; expresar un polinucleótido que codifica ARN que tenga una actividad de cortar específicamente un transcrito de dicho gen o genes; o expresar un polinucleótido que codifica ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de co-supresión. Estos polinucleótidos se pueden incorporar en un vector, el cual se puede introducir dentro del microorganismo mediante transformación para lograr la inactivación del gen o genes que codifican la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El término "inactivación" en el contexto de la presente invención significa preferentemente inactivación completa, es decir que el microorganismo no muestra actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.  
40 Esto significa en particular que el microorganismo no muestra actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa independiente de las condiciones de crecimiento usadas.

45 Preferentemente, "inactivación" significa que el gen o genes que codifican glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que están presentes en el microorganismo se modifican genéticamente para evitar la expresión de la enzima. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante supresión del gen o partes del mismo en la que la supresión de partes del mismo evita la expresión de la enzima, o mediante alteración del gen ya sea en la región codificadora o en la región de promotor en la que la alteración tiene el efecto de que no se expresa proteína o que se exprese una proteína disfuncional.

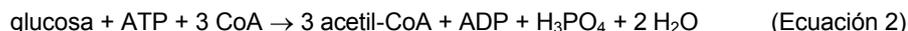
50 En una realización preferente, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene una rama oxidativa disminuida de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) debido a una modificación genética para reducir la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente. Esta reducción se logra mediante una modificación genética del microorganismo. Esto se puede lograr por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida a sitio del promotor y/o la enzima y selección posterior de los promotores y/o enzimas que tienen las propiedades deseadas o mediante secuencias de nucleótido complementarias o efecto de ARNi como se describió anteriormente. Más adelante se proporciona una descripción detallada de la modificación genética de microorganismos.  
55

60 En el contexto de la presente invención, una "actividad reducida" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en el microorganismo modificado genéticamente es por lo menos un 10 %, preferentemente por lo menos un 20 %, de manera más preferente por lo menos un 30 % o un 50 %, de manera incluso más preferente por lo menos un 70 % o un 80 % y particularmente preferente por lo menos un 90 % o un 100 % más baja que en el microorganismo no modificado correspondiente. Algunos

procedimientos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula son bien conocidos por el experto en la materia. Los ensayos para medir la actividad enzimática reducida de una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se conocen en la técnica.

5 En otra realización el microorganismo de acuerdo con la presente invención es un microorganismo que no posee una actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esto significa preferentemente que dicho microorganismo no posee de manera natural una actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esto significa que dicho microorganismo no contiene de manera natural en su genoma una secuencia de nucleótido que codifica una enzima con actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Algunos ejemplos para dichos microorganismos son *Acinetobacter baylyi* (Barbe y col., Nucl. Acids Res. 32 (2004), 5766-5779), arqueas del filo hipertermofílico tales como *Sulfolobus solfataricus* (Nunn y col., J. Biol. Chem. 285 (2010), 33701-33709), *Thermoproteus tenax*, *Thermoplasma acidophilum* y *Picrophilus torridus* (Reher y Schönheit, FEBS Lett. 580 (2006), 1198-1204).

10 En una realización adicional, el microorganismo de acuerdo con la presente invención también se caracteriza por tener actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, preferentemente cuando crece en glucosa. La fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa es una enzima que participa en la gluconeogénesis hidrolizando fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato y fosfato libre. Sin embargo, básicamente en todos los organismos en presencia de glucosa, la actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa se reprime y la glucosa se procesa a través de EMPP (glucólisis). El microorganismo de la presente invención, el cual tiene actividad de fosfocetolasa y el cual no posee actividad de fosfofructoquinasa o en el que la actividad de fosfofructoquinasa está reducida o cuyo gen que codifica la fosfofructoquinasa está inactivado, el rendimiento de acetil-CoA por conversión de fructosa-6-fosfato con la fosfocetolasa (EC 4.1.2.9 o EC 4.1.2.22) se puede incrementar asegurando la presencia de actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, por ejemplo mediante des-represión de la fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa en presencia de glucosa. La presencia de actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa da como resultado el reciclado de fructosa-1,6-bisfosfato producida por la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa en fructosa-6-fosfato la cual después de nuevo se puede convertir a través de la ruta de fosfocetolasa en acetil-CoA. En efecto, el producto fosfato de acetilo de la fosfocetolasa se interconvierte en acetil-CoA a través de la acción de la enzima fosfato acetiltransferasa EC 2.3.1.8. Por lo tanto, el microorganismo recombinante de la presente invención es capaz de producir acetil-CoA a partir de glucosa a una estequiometría que se aproxima a 3:1. La suma de las reacciones se da en la ecuación 2:



30 La expresión "actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa" significa una actividad enzimática que convierte fructosa-1,6-bisfosfato y H<sub>2</sub>O en fructosa-6-fosfato y fosfato (EC 3.1.3.11). Esta actividad enzimática se puede medir usando ensayos conocidos en la técnica como los descritos, por ejemplo, en Hines y col. (J. Biol. Chem. (2007) 282, 11696-11704). Las expresiones "actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa" y "fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa" también cubren enzimas que son bifuncionales en el sentido que éstas muestran una actividad de fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa/fosfatasa. Dichas enzimas bifuncionales se expresan en la mayoría de los linajes bacterianos de las arqueas y de ramificación profunda y, en la mayoría de los casos, son estables al calor. Dichas enzimas se informan, por ejemplo, para *Thermococcus kodakaraensis*, *Sulfolobus tokodaii*, *Ignicoccus hospitalis*, *Cenarchaeum symbiosum*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermus thermophilus*, *Thermoproteus neutrophilus*, *Moorelia thermoacetica* y muchas otras (véase, por ejemplo, Say y Fuchs (Nature 464 (2010), 1077); Fushinobu y col. (Nature 478 (2011), 538); Du y col. (Nature 478 (2011), 534)).

40 La expresión "actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa cuando crece en glucosa" significa que el microorganismo expresa una enzima con actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa cuando el microorganismo se cultiva en glucosa. "Cultivado en glucosa" significa que el microorganismo se cultiva en un medio que contiene, entre otros, glucosa como fuente de carbono. Preferentemente, esta expresión significa que el microorganismo se cultiva en un medio que contenía glucosa como la única fuente de carbono.

45 En el contexto de la presente invención, un microorganismo que tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, puede ser, por ejemplo, un microorganismo que de manera natural tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, o un microorganismo que no tiene de manera natural actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, y que se ha modificado genéticamente para expresar una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa. Este también podría ser un microorganismo que de manera natural tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, y que se ha modificado genéticamente, por ejemplo transformado con un ácido nucleico, por ejemplo un vector, que codifica una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa con el fin de incrementar la actividad de fosfocetolasa en dicho microorganismo.

55 En la técnica se conocen algunos microorganismos que de manera inherente, es decir de forma natural, tienen actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crecen en glucosa, y en el contexto de la presente invención se puede usar cualquiera de los mismos.

También es posible en el contexto de la presente invención que el microorganismo sea un microorganismo que de manera natural no tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, pero que se modifica genéticamente para que sea capaz de expresar una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular,

cuando crece en glucosa. Esto se puede lograr, por ejemplo, mutando el promotor del gen que codifica la fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa en una manera tal que el gen ya no esté reprimido cuando el microorganismo se cultiva en glucosa o el promotor se puede reemplazar por otro promotor por ejemplo un promotor constitutivo que no está regulado cuando el microorganismo se cultiva en glucosa.

5 De manera similar, el microorganismo también puede ser un microorganismo que de manera natural tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, pero que se modifica genéticamente para mejorar/incrementar la actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, por ejemplo mediante la introducción de una secuencia de nucleótido exógena que codifica una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa.

10 Más adelante se describe con mayor detalle la modificación genética de microorganismos para expresar una enzima de interés.

La fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa de acuerdo con la invención puede ser una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa que se produce de manera natural o puede ser una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa que se obtiene a partir de una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa que se produce de manera natural, por ejemplo mediante la introducción de mutaciones u otras alteraciones que, por ejemplo, alteran o mejoran la actividad enzimática, la estabilidad, etc. El experto en la materia conoce bien algunos procedimientos para modificar y/o mejorar las actividades enzimáticas deseadas de proteínas y se describieron anteriormente. Las variantes de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa resultantes se evalúan después respecto a sus propiedades, por ejemplo actividad enzimática o regulación. En la técnica se conocen algunos ensayos para medir la actividad enzimática de una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa. En una realización la fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa es una enzima que no está regulada por inhibición de retroalimentación.

En una realización preferente, el microorganismo recombinante se ha modificado genéticamente para que tenga una actividad incrementada de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa. Esto se puede lograr por ejemplo transformando el microorganismo con un ácido nucleico que codifica una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa. Más adelante se proporciona una descripción detallada de la modificación genética de microorganismos.

En el contexto de la presente invención, una "actividad incrementada" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular de la fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en el microorganismo modificado genéticamente cuando crece en glucosa es por lo menos un 10 %, preferentemente por lo menos un 20 %, de manera más preferente por lo menos un 30 % o un 50 %, de manera incluso más preferente por lo menos un 70 % o un 80 % y particularmente preferente por lo menos un 90 % o un 100 % más alta que en el microorganismo no modificado correspondiente cuando crece en glucosa. En realizaciones incluso más preferentes el incremento en la expresión y/o actividad puede ser por lo menos un 150 %, por lo menos un 200 % o por lo menos un 500 %. En realizaciones particularmente preferentes la expresión es por lo menos 10 veces, de manera más preferente por lo menos 100 veces e incluso más preferente por lo menos 1000 veces más alta que en el microorganismo no modificado correspondiente en particular cuando crece en glucosa.

El experto en la materia conoce bien algunos procedimientos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula. En una realización, la medición del nivel de expresión se hace midiendo la cantidad de la proteína correspondiente. El experto en la materia conoce bien algunos procedimientos correspondientes e incluyen Western Blot, ELISA etc. En otra realización la medición del nivel de expresión se hace midiendo la cantidad del ARN correspondiente. El experto en la materia conoce bien algunos procedimientos correspondientes e incluyen, por ejemplo, Northern Blot.

En la técnica se conocen algunos procedimientos para medir la actividad enzimática de la fructosa-1,6-bisfosfato.

En otra realización, el microorganismo de acuerdo con la presente invención se caracteriza también porque la EMPP está adicionalmente disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o mediante modificación genética para reducir la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente. La disminución adicional de la EMPP en una etapa más corriente abajo disminuyendo o inactivando la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa asegura que ninguno o casi ninguno del gliceraldehído-3-fosfato que se pudiera producir en el microorganismo sea procesado a través de la glucólisis hasta acetil-CoA con lo cual se perdería un átomo de carbono por la liberación de CO<sub>2</sub> en la última etapa catalizado por la piruvato deshidrogenasa. Por lo tanto, bloquear la EMPP disminuyendo o inactivando la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa asegura adicionalmente que el flujo global se dirija hacia la fosfocetolasa.

La "actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa" significa una actividad enzimática que convierte gliceraldehído-3-fosfato, fosfato y NAD<sup>+</sup> en 3-fosfo-D-gliceroil fosfato y NADH + H<sup>+</sup> (EC 1.2.1.12). Esta actividad se puede medir usando ensayos conocidos en la técnica como los descritos, por ejemplo, en D'Alessio y col. (J. Biol. Chem. (1971) 246, 4326-4333).

La expresión "un microorganismo que se caracteriza por tener una ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) adicionalmente disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican una gliceraldehído-3-fosfato

deshidrogenasa o mediante modificación genética para reducir la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente" se refiere a un microorganismo en el que la inactivación del gen o genes que codifican una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o la reducción de la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente se logra mediante una modificación genética del microorganismo que lleva a dicha inactivación o reducción.

En una realización preferente, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante en el que la EMPP está adicionalmente disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o debido a una modificación genética para reducir la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente. La inactivación del gen o genes que codifican una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en el contexto de la presente invención significa que el gen o genes que codifican la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa que está (están) presente(s) en el microorganismo está (están) inactivados de modo tal que éstos ya no se expresan y/o ya no llevan a la síntesis de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa funcional. La inactivación se puede lograr mediante muchas maneras diferentes conocidas en la técnica. La inactivación se puede lograr, por ejemplo, mediante la alteración del gen o genes que codifican la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o mediante supresión limpia de dicho gen o genes a través de la introducción de un marcador de selección. De manera alternativa, el promotor del gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se puede mutar en una manera que el gen o genes ya no se transcriba(n) como ARNm. Otras maneras para inactivar el gen o genes que codifican la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa conocidas en la técnica son: expresar un polinucleótido que codifica ARN que tiene una secuencia de nucleótido complementaria al transcrito del gen o genes de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de modo tal que el ARNm ya no se puede traducir en una proteína, expresar un polinucleótido que codifica ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de ARNi; expresar un polinucleótido que codifica ARN que tenga una actividad de cortar específicamente un transcrito de dicho gen o genes; o expresar un polinucleótido que codifica ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de co-supresión. Estos polinucleótidos se pueden incorporar en un vector, el cual se puede introducir dentro del microorganismo mediante transformación para lograr la inactivación del gen o genes que codifican la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

El término "inactivación" en el contexto de la presente invención significa preferentemente inactivación completa, es decir que el microorganismo no muestra actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Esto significa en particular que el microorganismo no muestra actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa independiente de las condiciones de crecimiento usadas.

Preferentemente, "inactivación" significa que el gen o genes que codifican gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa los cuales están presentes en el microorganismo se modifican genéticamente para evitar la expresión de la enzima. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante supresión del gen o partes del mismo en la que la supresión de partes del mismo evita la expresión de la enzima, o mediante alteración del gen ya sea en la región codificadora o en la región de promotor en la que la alteración tiene el efecto de que no se expresa proteína o que se exprese una proteína disfuncional.

En una realización preferente, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene una EMPP disminuida debido a una modificación genética para reducir la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente. Esta reducción se logra mediante una modificación genética del microorganismo. Esto se puede lograr por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida a sitio del promotor y/o la enzima y selección posterior de los promotores y/o enzimas que tienen las propiedades deseadas o mediante secuencias de nucleótido complementarias o efecto de ARNi como se describió anteriormente. Más adelante se proporciona una descripción detallada de la modificación genética de microorganismos.

En el contexto de la presente invención, una "actividad reducida" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, en el microorganismo modificado genéticamente es por lo menos un 10 %, preferentemente por lo menos un 20 %. de manera más preferente por lo menos un 30 % o un 50 %, de manera incluso más preferente por lo menos un 70 % o un 80 % y particularmente preferente por lo menos un 90 % o un 100 % más baja que en el microorganismo no modificado correspondiente. El experto en la materia conoce bien algunos procedimientos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula. En la técnica se conocen algunos ensayos para medir la actividad enzimática reducida de una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

El término "microorganismo" en el contexto de la presente invención se refiere a bacterias, así como a hongos, tales como levaduras, y también a algas y arqueas. En una realización preferente, el microorganismo es una bacteria. En principio se puede usar cualquier bacteria. Las bacterias preferentes para su uso en el procedimiento de acuerdo con la invención son bacterias del género *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Zymomonas* o *Escherichia*. En una realización particularmente preferente la bacteria pertenece al género *Escherichia* e incluso más preferente a la especie *Escherichia coli*. En otra realización preferente la bacteria pertenece a la especie *Pseudomonas putida* o a la especie *Zymomonas mobilis* o a la especie *Corynebacterium glutamicum*.

En otra realización preferente el microorganismo es un hongo, de manera más preferente un hongo del género *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Kluyveromyces* o *Pichia* y de manera incluso más preferente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Pichia torula* o *Pichia utilis*.

- 5 En una realización más preferente, en la que el microorganismo recombinante es una bacteria, el gen o genes que codifican el transportador de PTS dependiente de PEP se han inactivado. En el contexto de la presente invención, inactivación significa que el gen o genes que codifican transportador de PTS dependiente de PEP que está (están) presente(s) en el microorganismo se inactiva(n) de modo tal que éstos ya no se expresan y/o ya no llevan a la síntesis de transportador de PTS dependiente de PEP funcional. La inactivación del gen o genes que codifican el  
10 transportador de PTS dependiente de PEP debe ser de tal manera que la bacteria ya no sea capaz de transportar glucosa a través del transportador de PTS dependiente de PEP.

Los transportadores de PTS dependiente de PEP (por ejemplo provenientes de *E. coli*, *B. subtilis*) se conocen en la técnica. Un ejemplo para la inactivación del transportador de PTS dependiente de PEP se muestra en la sección de Ejemplos más adelante.

- 15 La inactivación se puede lograr mediante muchas maneras diferentes conocidas en la técnica. La inactivación se puede lograr, por ejemplo, mediante la alteración del gen o genes que codifican el transportador de PTS dependiente de PEP o mediante supresión limpia de dicho gen o genes a través de la introducción de un marcador de selección. De manera alternativa, el promotor del gen o genes que codifican el transportador de PTS dependiente de PEP se puede mutar en una manera que el gen o genes ya no se transcriba(n) como ARNm. Otras maneras para  
20 inactivar el gen o genes que codifican el transportador de PTS dependiente de PEP conocidas en la técnica son: expresar un polinucleótido que codifica ARN que tiene una secuencia de nucleótido complementaria al transcrito del gen o genes del transportador de PTS dependiente de PEP de modo tal que el ARNm ya no se puede traducir como una proteína, expresar un polinucleótido que codifica ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de ARNi; expresar un polinucleótido que codifica ARN que tenga una actividad de cortar específicamente  
25 un transcrito de dicho gen o genes; o expresar un polinucleótido que codifica ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de co-supresión. Estos polinucleótidos se pueden incorporar en un vector, el cual se puede introducir dentro del microorganismo mediante transformación para lograr la inactivación del gen o genes que codifican el transportador de PTS dependiente de PEP.

- 30 El término "recombinante" significa que el microorganismo de la presente invención se modifica genéticamente de modo tal que contenga una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima como se definió anteriormente en comparación con un microorganismo de tipo silvestre o no modificado o de modo tal que se haya eliminado un gen que codifica una enzima como se definió anteriormente en comparación con un microorganismo de tipo silvestre o no modificado.

- 35 Una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima como se definió anteriormente se puede usar sola o como parte de un vector.

- Las moléculas de ácido nucleico también pueden comprender secuencias para control de expresión ligadas en forma operable al polinucleótido comprendido en la molécula de ácido nucleico. La expresión "ligado en forma operativa" o "ligado en forma operable", tal como se usa a través de toda la presente descripción, se refiere a un  
40 enlace entre una o más secuencias de control de expresión y la región codificadora en el polinucleótido que se va a expresar de tal manera que la expresión se logra bajo condiciones compatibles con la secuencia de control de expresión.

- Expresión comprende transcripción de la secuencia de ADN heteróloga, preferentemente como un ARNm susceptible de traducción. Los expertos en la materia conocen bien algunos elementos reguladores que aseguran la expresión en hongos así como en bacterias. Estos abarcan promotores, incrementadores, señales de terminación,  
45 señales para elección de blanco y similares. Los ejemplos se dan más adelante en conexión con las explicaciones concernientes a los vectores.

- Algunos promotores para uso en conexión con la molécula de ácido nucleico pueden ser homólogos o heterólogos con respecto a su origen y/o con respecto al gen que se va a expresar. Algunos promotores apropiados son por ejemplo promotores que se prestan por sí mismos a la expresión constitutiva. Sin embargo, también se pueden usar  
50 promotores que solamente se activan en un punto en el tiempo determinado por influencias externas. En este contexto se pueden usar promotores artificiales y/o químicamente inducibles.

Los vectores también pueden comprender secuencias de control de expresión ligadas en forma operable a dichos polinucleótidos contenidos en los vectores. Estas secuencias de control de expresión pueden ser adecuadas para asegurar la transcripción y síntesis de un ARN susceptible de traducción en bacterias u hongos.

- 55 Además, es posible insertar diferentes mutaciones dentro de los polinucleótidos usando procedimientos usuales en biología molecular (véase por ejemplo Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.), lo que lleva a la síntesis de polipéptidos que posiblemente tienen propiedades biológicas modificadas. La introducción de mutaciones puntuales es concebible en posiciones en las

que una modificación de la secuencia de aminoácido por ejemplo influye en la actividad biológica o la regulación del polipéptido.

Asimismo, se pueden preparar mutantes que posean una especificidad modificada para sustrato o producto. Preferentemente, dichos mutantes muestran una actividad incrementada. De manera alternativa, se pueden preparar mutantes cuya actividad catalítica se elimine sin perder actividad de unión al sustrato.

Asimismo, la introducción de mutaciones dentro de los polinucleótidos que codifican una enzima como se definió anteriormente permite que se reduzca o se incremente la tasa de expresión del gen y/o la actividad de las enzimas codificadas por dichos polinucleótidos.

Para modificar genéticamente las bacterias u hongos, los polinucleótidos que codifican una enzima como se definió anteriormente o partes de estas moléculas se pueden introducir dentro de plásmidos que permiten la mutagénesis o modificación de secuencia mediante recombinación de secuencias de ADN. Algunos procedimientos convencionales (véase Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press. Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.) permiten que se puedan efectuar intercambios de bases o que se agreguen secuencias naturales o sintéticas. Algunos fragmentos de ADN se pueden conectar entre sí aplicando adaptadores y enlazadores a los fragmentos. Asimismo, se pueden usar medidas de ingeniería que proporcionen sitios de restricción apropiados o que eliminen ADN o sitios de restricción sobrantes. En aquellos casos, en los que son posibles inserciones, supresiones o sustituciones, se pueden usar mutagénesis *in vitro*, "reparación de cebador", restricción o ligación. En general, como procedimientos de análisis se realizan un análisis de secuencia, análisis de restricción y otros procedimientos de bioquímica y biología molecular.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención se puede producir un microorganismo recombinante modificando genéticamente hongos o bacterias que comprende introducir los polinucleótidos, moléculas de ácido nucleico o vectores descritos anteriormente dentro de un hongo o bacteria.

La invención se refiere a microorganismos recombinantes, en particular bacterias y hongos, modificados genéticamente con los polinucleótidos, moléculas de ácido nucleico o vectores descritos anteriormente o que se pueden obtener mediante el procedimiento mencionado anteriormente para producir bacterias u hongos modificados genéticamente, y a células derivadas de dichas bacterias u hongos transformados y que contienen un polinucleótido, molécula de ácido nucleico o vector como se definió anteriormente. En una realización preferente la célula hospedadora está genéticamente modificada de tal manera que ésta contiene al polinucleótido integrado de manera estable en el genoma.

El polinucleótido se expresa para llevar a la producción de un polipéptido que tiene cualquiera de las actividades descritas anteriormente. Una revisión de los diferentes sistemas de expresión está contenida por ejemplo en *Methods in Enzymology* 153 (1987), 385-516, en Bitter y col. (*Methods in Enzymology* 153 (1987), 516-544) y en Sawers y col. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 46 (1996), 1-9), Billman-Jacobe (*Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 500-4), Hockney (*Trends in Biotechnology* 12 (1994), 456-463), Griffiths y col., (*Methods in Molecular Biology* 75 (1997), 427-440). Una revisión de los sistemas de expresión en levadura es dada por ejemplo por Hensing y col. (*Antonie van Leeuwenhoek* 67 (1995), 261-279), Bussineau y col. (*Developments in Biological Standardization* 83 (1994), 13-19), Gellissen y col. (*Antonie van Leeuwenhoek* 62 (1992), 79-93), Fleer (*Current Opinion in Biotechnology* 3 (1992), 486-496), Vedvick (*Current Opinion in Biotechnology* 2 (1991), 742-745) y Buckholz (*Bio/Technology* 9 (1991), 1067-1072).

En la bibliografía se han descrito ampliamente algunos vectores de expresión. Como regla, estos contienen no solamente un gen marcador de selección y un origen de replicación que asegura la replicación en el hospedador seleccionado, sino también un promotor bacteriano o viral, y en la mayoría de los casos una señal de terminación para transcripción. Entre el promotor y la señal de terminación hay en general por lo menos un sitio de restricción o un polienlazador el cual permite la inserción de una secuencia de ADN codificadora. La secuencia de ADN que controla de manera natural la transcripción del gen correspondiente se puede usar como la secuencia de promotor, si ésta es activa en el organismo hospedador seleccionado. Sin embargo, esta secuencia también se puede intercambiar por otras secuencias de promotor. Es posible usar promotores que aseguren la expresión constitutiva del gen y promotores inducibles que permiten un control deliberado de la expresión del gen. Las secuencias de promotor bacterianas y virales que poseen estas propiedades son descritas en detalle en la bibliografía. Las secuencias reguladoras para la expresión en microorganismos (por ejemplo *E. coli*, *S. cerevisiae*) son descritas en forma suficiente en la bibliografía. Los promotores que permiten una expresión particularmente alta de una secuencia corriente abajo son por ejemplo el promotor T7 (Studier y col., *Methods in Enzymology* 85 (1990), 60-89), lacUV5, trp, trp-lacUV5 (DeBoer y col., en Rodríguez y Chamberlin (Eds), *Promoters, Structure and Function*: Praeger, New York, (1982), 462-481; DeBoer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983), 21-25), lp1, rac (Boros y col., *Gene* 42 (1986), 97-100). Algunos promotores inducibles se usan preferentemente para la síntesis de polipéptidos. Estos promotores con frecuencia llevan a rendimientos de polipéptido más altos que los promotores constitutivos. Con el fin de obtener una cantidad óptima de polipéptido, con frecuencia se usa un procedimiento de dos etapas. Primero, las células hospederas se cultivan bajo condiciones óptimas hasta una densidad celular relativamente alta. En la segunda etapa, se induce la transcripción dependiendo del tipo de promotor usado. En este sentido, un promotor tac es particularmente apropiado el cual puede ser inducido por lactosa o IPTG (=isopropil- $\beta$ -D-

tiogalactopiranosido) (deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 21-25). Las señales de terminación para la transcripción también se describen en la bibliografía.

La transformación de la célula hospedadora con un polinucleótido o vector de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo usando procedimientos convencionales, como por ejemplo los descritos en Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. La célula hospedadora se cultiva en medio nutritivo que satisfaga los requerimientos de la célula hospedadora particular usada, en particular con respecto al valor de pH, temperatura, concentración de sal, aireación, antibióticos, vitaminas, elementos traza, etc.

En otro aspecto de la presente invención, el microorganismo recombinante también se caracteriza porque es capaz de convertir acetil-CoA en acetona. Algunos procedimientos para proporcionar dicho microorganismo recombinante se describen por ejemplo en el documento de patente EP 2 295 593. La expresión "que es capaz de convertir acetil-CoA en acetona" en el contexto de la presente invención significa que el organismo/microorganismo tiene la capacidad de producir acetona dentro de la célula debido a la presencia de enzimas que proporcionan actividades enzimáticas que permiten la producción de acetona a partir de acetil-CoA.

La acetona es producida por ciertos microorganismos, tales como *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium cellulolyticum*, *Bacillus polymyxa* y *Pseudomonas putida*. La síntesis de acetona se caracteriza de manera más adecuada en *Clostridium acetobutylicum*. Esta empieza con una reacción (etapa de reacción 1) en la que dos moléculas de acetil-CoA se condensan como acetoacetil-CoA. Esta reacción es catalizada por acetil-CoA acetiltransferasa (EC 2.3.1.9). La acetoacetil-CoA después se convierte en acetoacetato por una reacción con ácido acético o ácido butírico que da como resultado también la producción de acetil-CoA o butiril-CoA (etapa de reacción 2). Esta reacción es catalizada por ejemplo por acetoacetilCoA transferasa (EC 2.8.3.8). La acetoacetilCoA transferasa es conocida a partir de varios organismos, por ejemplo a partir de *E. coli* en la que ésta es codificada por el gen atoAD o a partir de *Clostridium acetobutylicum* en el que ésta es codificada por el gen ctfAB. Sin embargo, también otras enzimas pueden catalizar esta reacción, por ejemplo 3-oxoácido CoA transferasa (EC 2.8.3.5) o succinato CoA ligasa (EC 6.2.1.5).

Por último, el acetoacetato se convierte en acetona mediante una etapa de descarboxilación (etapa de reacción 3) catalizado por la acetoacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.4).

Las etapas de reacción 1 y 2 descritas anteriormente y las enzimas que los catalizan no son característicos para la síntesis de acetona y se pueden encontrar en varios organismos. En contraste, la etapa de reacción 3 que se cataliza por la acetoacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.4) se encuentra solamente en aquellos organismos que son capaces de producir acetona.

En una realización preferente el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo, el cual de manera natural tiene la capacidad de producir acetona. Por lo tanto, preferentemente el microorganismo pertenece al género *Clostridium*, *Bacillus* o *Pseudomonas*, de manera más preferente a la especie *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium cellulolyticum*, *Bacillus polymyxa* o *Pseudomonas putida*.

En otra realización preferente, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo, obtenido a partir de un organismo/microorganismo el cual de manera natural no produce acetona pero que se ha modificado genéticamente para que produzca acetona, es decir introduciendo el gen o genes necesarios para permitir la producción de acetona en el microorganismo. En principio cualquier microorganismo se puede modificar genéticamente de esta manera. Las enzimas responsables para la síntesis de acetona se han descrito anteriormente. Los genes que codifican las enzimas correspondientes se conocen en la técnica y se pueden usar para modificar genéticamente un microorganismo dado para que produzca acetona. Como se describió anteriormente, las etapas de reacción 1 y 2 de la síntesis de acetona ocurren de manera natural en la mayoría de los organismos. Sin embargo, la etapa de reacción 3 es característica y crucial para la síntesis de acetona. Por lo tanto, en una realización preferente, se modifica un organismo modificado genéticamente obtenido a partir de un microorganismo que de manera natural no produce acetona para que contenga una secuencia de nucleótido que codifica una enzima que cataliza la conversión de acetoacetato en acetona mediante descarboxilación, por ejemplo una acetoacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.4). En la técnica se conocen algunas secuencias de nucleótido provenientes de diversos organismos que codifican esta enzima, por ejemplo el gen adc proveniente de *Clostridium acetobutylicum* (números de referencia Uniprot P23670 y P23673), *Clostridium beijerinckii* (*Clostridium* MP; Q9RPK1), *Clostridium pasteurianum* (número de referencia Uniprot P81336), *Bradyrhizobium* sp. (cepa BTAi1/ATCC BAA-1182; número de referencia Uniprot A5EBU7), *Burkholderia mallei* (ATCC 10399 A9LBS0), *Burkholderia mallei* (número de referencia Uniprot A3MAE3), *Burkholderia mallei* FMH A5XJB2, *Burkholderia cenocepacia* (número de referencia Uniprot A0B471), *Burkholderia ambifaria* (número de referencia Uniprot Q0b5P1), *Burkholderia phytofirmans* (número de referencia Uniprot B2T319), *Burkholderia* spec. (número de referencia Uniprot Q38ZU0), *Clostridium botulinum* (número de referencia Uniprot B2TLN8), *Ralstonia pickettii* (número de referencia Uniprot B2UIG7), *Streptomyces nogalater* (número de referencia Uniprot Q9EY17), *Streptomyces avermitilis* (número de referencia Uniprot Q82NF4), *Legionella pneumophila* (número de referencia Uniprot Q5ZXQ9), *Lactobacillus salivarius* (número de referencia Uniprot Q1WVG5), *Rhodococcus* spec. (número de referencia Uniprot Q0S7W4), *Lactobacillus plantarum* (número de referencia Uniprot Q890G0), *Rhizobium leguminosarum* (número de referencia

Uniprot Q1M911), *Lactobacillus casei* (número de referencia Uniprot Q03B66), *Francisella tularensis* (número de referencia Uniprot Q0BLC9), *Saccharopolyspora erythraea* (número de referencia Uniprot A4FKR9), *Korarchaeum cryptofilum* (número de referencia Uniprot B1L3N6), *Bacillus amyloliquefaciens* (número de referencia Uniprot A7Z8K8), *Cochliobolus heterostrophus* (número de referencia Uniprot Q8NJK3), *Sulfolobus islandicus* (número de referencia Uniprot C3ML22) y *Francisella tularensis* subsp. holarctica (cepa OSU18).

De manera más preferente, el microorganismo se modifica genéticamente para que se transforme con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 2 de la síntesis de acetona mencionada anteriormente, es decir la conversión de acetoacetil-CoA en acetoacetato.

Incluso de manera más preferente, el microorganismo se modifica genéticamente para que sea transformado con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 1 de la síntesis de acetona mencionada anteriormente, es decir la condensación de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA.

En una realización particularmente preferente el microorganismo se modifica genéticamente para que se transforme con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 1 de la síntesis de acetona mencionada anteriormente y con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 2 de la síntesis de acetona mencionada anteriormente o con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 1 de la síntesis de acetona mencionada anteriormente y con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 3 mencionada anteriormente de la síntesis de acetona o con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 2 de la síntesis de acetona mencionada anteriormente y con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 3 mencionada anteriormente de la síntesis de acetona o con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 1 de la síntesis de acetona mencionada anteriormente y con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 2 de la síntesis de acetona mencionada anteriormente y con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que puede catalizar la etapa de reacción 3 mencionada anteriormente de la síntesis de acetona.

Los procedimientos para preparar los microorganismos modificados genéticamente mencionados anteriormente se conocen bien en la técnica. Por lo tanto, en términos generales, el microorganismo se transformó con una construcción de ADN que permite la expresión de la enzima respectiva en el microorganismo. Dicha construcción normalmente comprende la secuencia codificadora en cuestión ligada a secuencias reguladoras que permiten la transcripción y traducción en la célula hospedadora respectiva, por ejemplo un promotor y/o incrementador y/o terminador de transcripción y/o sitios de unión a ribosoma, etc. La técnica anterior ya describe microorganismos que se han modificado genéticamente para que sean capaces de producir acetona. En particular los genes provenientes de, por ejemplo, *Clostridium acetobutylicum* se han introducido en *E. coli* con lo cual se permite la síntesis de acetona en *E. coli*, una bacteria que no produce acetona de manera natural (Bermejo y col., Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998); 1079-1085; Hanai y col., Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007), 7814-7818). En particular Hanai y col. (mencionado anteriormente) muestran que es suficiente introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica una acetoacetato descarboxilasa (tal como la que proviene de *Clostridium acetobutylicum*) con el fin de lograr la producción de acetona en *E. coli* lo que indica que las enzimas endógenas en *E. coli* catalizan las etapas de reacción 1 y 2 mencionadas anteriormente (es decir los productos de expresión de los genes atoB y atoAD de *E. coli*) son suficientes para proporcionar sustrato para la producción de acetona.

En otro aspecto de la presente invención, el microorganismo recombinante también se caracteriza porque es capaz de convertir acetil-CoA en acetona y convertir acetona en isobuteno. Algunos procedimientos para proporcionar dicho microorganismo recombinante se describen por ejemplo en los documentos EP-A 2 295 593 (EP 09 17 0312), WO 2010/001078 y EP 10 18 8001.

En otro aspecto de la presente invención, el microorganismo recombinante se caracteriza porque es capaz de convertir acetil-CoA en acetona y convertir acetona en propeno. Algunos procedimientos para proporcionar dicho microorganismo recombinante se describen por ejemplo en Hanai y col., Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007), 7814-7818.

Un experto en la materia reconocerá que algunas modificaciones genéticas adicionales a los microorganismos de la presente invención podrían llevar a mejoras en la eficacia mediante las cuales los microorganismos de la presente invención convierten el material de abastecimiento en producto. Por ejemplo, algunos microorganismos naturales comúnmente producen productos tales como formiato, acetato, lactato, succinato, etanol, glicerol, 2,3-butanodiol, metilglicoxal e hidrógeno; de los cuales todos podrían ser perjudiciales para la producción de, por ejemplo, acetona, isobuteno o propeno a partir de azúcares. La eliminación o reducción sustancial de dichos subproductos no deseados se puede lograr mediante eliminación o reducción de las actividades de enzimas clave que llevan a su producción. Dichas actividades incluyen, pero no se limitan a, el grupo que consiste en:

- $\text{acetil-CoA} + \text{formiato} = \text{CoA} + \text{piruvato}$  (por ejemplo, catalizado por la formiato C-acetiltransferasa, también conocida como piruvato formiato-liasa (EC 2.3.1.54); para *E. coli*- *pflB*, ID de Gen de NCBI: 945514);
- $\text{ATP} + \text{acetato} = \text{ADP} + \text{fosfato de acetilo}$  (por ejemplo, catalizado por acetato quinasa (EC 2.7.2.1); para *E. coli*-

- ackA*, ID de Gen de NCBI: 946775);
- (*R*)-*lactato* +  $NAD^+$  = *piruvato* +  $NADH + H^+$  (por ejemplo, catalizado por L-lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.28); para *E. coli*- *ldhA*, ID de Gen de NCBI: 946315);
  - 5 - *fosfato* + *oxaloacetato* = *fosfoenolpiruvato* +  $HCO_3^-$  (por ejemplo, catalizado por fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31); para *E. coli*- *ppc*, ID de Gen de NCBI: 948457);
  - $ATP + oxaloacetato = ADP + fosfoenolpiruvato + CO_2$  (por ejemplo, catalizado por fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ATP) (EC 4.1.1.49); para *E. coli*- *pck*, ID de Gen de NCBI: 945667);
  - *succinato* + *aceptor* = *fumarato* + *aceptor reducido* (por ejemplo, catalizado por succinato deshidrogenasa (EC 1.3.99.1); para *E. coli*- que comprende *frdA* y *frdB*, ID de Gen de NCBI: 948667 y 948666, respectivamente);
  - 10 - un *2-oxo carboxilato* (por ejemplo *piruvato*) = un *aldehído* (por ejemplo *acetaldehído* +  $CO_2$  (por ejemplo, catalizado por piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1));
  - *acetaldehído* +  $CoA + NAD^+ = acetil-CoA + NADH + H^+$  (por ejemplo, catalizado por acetaldehído deshidrogenasa (acetiladora) (EC 1.2.1.10); para *E. coli*- *adhE*, ID de Gen de NCBI: 945837);
  - 15 - *sn-glicerol 3-fosfato* +  $NAD(P)^+ = glicerona fosfato + NAD(P)H + H^+$  (por ejemplo, catalizado por glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD(P)+] (EC 1.1.1.94); para *E. coli*- *gpsA*, ID de Gen de NCBI: 948125);
  - $2 \text{ piruvato} = 2\text{-acetolactato} + CO_2$  (por ejemplo, catalizado por acetolactato sintetasa (EC 2.2.1.6); para *E. coli*- *ilvH* e *ilvI*, ID de Gen de NCBI: 947267 y 948793, respectivamente);
  - *glicerona fosfato* = *metilglioxal* + *fosfato* (por ejemplo, catalizado por metilglioxal sintetasa (EC 4.2.3.3); para *E. coli*- *mgsA*, ID de Gen de NCBI: 945574); y
  - 20 -  $formiato + H^+ = CO_2 + H_2$  (por ejemplo, catalizado por formiato hidrogenoliasa (EC 1.2.1.2 junto con EC 1.12.1.2); para *E. coli*- *fdhF* (EC 1.2.1.2), ID de Gen de NCBI: 948584).

Por lo tanto, en una realización preferente, el microorganismo de acuerdo con la invención se caracteriza porque una o más de las actividades enzimáticas listadas anteriormente se eliminan o se reducen.

- 25 Un experto en la materia también reconocería que las modificaciones genéticas a los elementos reguladores en los microorganismos de la presente invención podrían llevar a mejoras en la eficacia con las cuales los microorganismos de la presente invención convierten el material de abastecimiento en producto. Dentro de *E. coli*, dichas modificaciones genéticas incluyen, pero no se limitan a, el grupo que consiste en:

- eliminar el gen *fnr* (ID de Gen de NCBI: 945908), un regulador global de crecimiento anaeróbico; y
- eliminar el gen *rpoS* (ID de Gen de NCBI: 947210), una ARN polimerasa, factor sigma S (sigma 38).

- 30 Por lo tanto, en otra realización preferente el microorganismo de acuerdo con la invención muestra por lo menos una de estas supresiones.

- 35 Un aspecto adicional de la presente invención es el uso del microorganismo recombinante de la presente invención para la conversión de glucosa en acetil-CoA. La acetil-CoA (también conocida como acetil-Coenzima A) en la estructura química es el tioéster entre la coenzima A (un tiol) y ácido acético y es una molécula precursora importante para la producción de metabolitos útiles. La acetil-CoA después se puede convertir adicionalmente por el microorganismo recombinante en metabolitos útiles tales como ácido L-glutámico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, succinato y polihidroxibutirato.

Otro aspecto de la presente invención es el uso del microorganismo recombinante de la presente invención que es capaz de convertir acetil-CoA en acetona para la conversión de glucosa en acetona.

- 40 Un aspecto adicional de la presente invención es el uso del microorganismo recombinante de la presente invención que es capaz de convertir acetil-CoA en acetona y acetona en isobuteno para la conversión de glucosa en isobuteno.

- 45 De nuevo un aspecto adicional de la presente invención es el uso del microorganismo recombinante de la presente invención que es capaz de convertir acetil-CoA en acetona y acetona en propeno para la conversión de glucosa en propeno.

- 50 Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de acetona y/o isobuteno y/o propeno a partir de glucosa en el que el microorganismo recombinante mencionado anteriormente se cultiva bajo condiciones que permitan la producción de acetona y/o isobuteno y/o propeno y en el que se aíslan la acetona y/o isobuteno y/o propeno. Los microorganismos se cultivan bajo condiciones de cultivo apropiadas que permitan que ocurran las reacciones enzimáticas. Las condiciones de cultivo específicas dependen del microorganismo específico empleado pero son bien conocidas por el experto en la materia. Las condiciones de cultivo generalmente se eligen de tal manera que éstas permitan la expresión de los genes que codifican las enzimas para las reacciones respectivas. El experto en la materia conoce varios procedimientos para mejorar y afinar la expresión de ciertos genes en ciertas etapas del cultivo tal como la inducción de la expresión de genes mediante inductores químicos o mediante un cambio de temperatura.
- 55

En otra realización preferente el procedimiento de acuerdo con la invención comprende también la etapa de recolectar los productos gaseosos, en particular isobuteno o propeno, mediante desgasificación de la reacción, es decir recuperar los productos que desgasifican, por ejemplo, fuera del cultivo. Por lo tanto en una realización

preferente, el procedimiento se realiza en presencia de un sistema para recolectar isobuteno o propeno bajo forma gaseosa durante la reacción.

- 5 De hecho, los alquenos cortos tales como isobuteno y propeno adoptan el estado gaseoso a temperatura ambiente y presión atmosférica. El procedimiento de acuerdo con la invención por lo tanto no requiere la extracción del producto a partir del medio de cultivo líquido, una etapa que siempre es muy costoso cuando se realiza a escala industrial. La evacuación y almacenamiento de los hidrocarburos gaseosos y su posible separación física posterior y conversión química se pueden efectuar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia.

La presente invención se describe adicionalmente por referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

- 10 La **Figura 1** muestra dos esquemas para la producción de acetil-CoA a partir de glucosa-6-fosfato a través de la ruta de fosfocetolasa usando cualquiera o ambas actividades de fosfocetolasa EC 4.1.2.9 y EC 4.1.2.22.

### Ejemplos

#### PROCEDIMIENTOS GENERALES Y MATERIALES

- 15 En la técnica se conocen bien algunos procedimientos para las ligaciones y transformaciones. Las técnicas apropiadas para uso en los siguientes ejemplos se pueden encontrar en Sambrook J., y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, y Sambrook J., mencionado anteriormente.

En la técnica se conocen bien algunos materiales y procedimientos apropiados para el mantenimiento y crecimiento de los cultivos bacterianos. Algunas técnicas apropiadas para uso en los siguientes ejemplos se pueden encontrar en *Manual of Methods for General Bacteriology* (Philipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Philips, eds).

- 20 Todos los reactivos y materiales usados para el crecimiento y mantenimiento de las células bacterianas se obtienen a partir de Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO) a menos que se especifique de otra manera.

TABLA 1: Plásmidos usados y construidos

Nombre del Plásmido	Descripción
pKD46	Datsenko KA. y Wanner BL., <i>Proceedings of the National Academy of Sciences</i> , 2000, Vol. 97, N° 12, pp. 6640-6645
pCP20	Datsenko KA. y Wanner BL., <i>Proceedings of the National Academy of Sciences</i> , 2000, Vol. 97, N° 12, pp. 6640-6645
pGBE0687	El plásmido pGBE0687 presenta un gen de resistencia a apramicina colocado bajo el control de su propio promotor
pGBE0688	El plásmido pGBE0688 presenta un gen de resistencia a espectinomicina colocado bajo el control de su propio promotor
pGBE0421	Plásmido de GeneArt® (Invitrogen) que codifica fosfocetolasa de <i>L. lactis</i>
pGBE0123	Una versión modificada del plásmido pUC18 (New England Biolabs) el cual contiene un Sitio de Clonación Múltiple (MCS) modificado.
pGBE0457	Plásmido que permite la expresión de la fosfocetolasa de <i>L. lactis</i>
pGBE0689	Fagémidos pBluescript II, Agilent Technologies
pGBE0690	Genes <i>ctfA</i> y <i>ctfB</i> provenientes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> clonados en pGBE0689
pGBE0691	Gen <i>adc</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> clonado en pGBE0690
pGBE0051	pUC19, New England Biolabs
pGBE0692	Genes <i>ctfA</i> , <i>ctfB</i> y <i>adc</i> provenientes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> clonados en pGBE0051
pGBE0693	Gen <i>thl</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> clonado en pGBE0692
pGBE0124	Una versión modificada del plásmido pSU18 (Borja Bartolomé, Yolanda Jubete, Eduardo Martínez y Fernando de la Cruz, <i>Gene</i> , 1991, Vol. 102, Fascículo 1, pp. 75-78)

(continuación)

Nombre del Plásmido	Descripción
pGBE0096	Genes <i>thl</i> , <i>ctfA</i> , <i>ctfB</i> y <i>adc</i> provenientes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> clonados en pGBE0124
pGBE0928	Plásmido que permite la expresión de la fosfoacetolasa de <i>L. lactis</i>
pGBE1020	Plásmido que permite la expresión de la fosfoacetolasa de <i>L. lactis</i> y la producción de acetona
pGBE1021	Plásmido que permite la producción de acetona

**TABLA 2: Cepas usadas y construidas**

FRT : objetivo de reconocimiento de FLP			
Nombre de cepa	Genotipo	Cepa de origen de la construcción	
GBE0219	F-lambda-ilvG-rfb-50 rph-1		<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 de tipo silvestre
GBE0170	pKD46	GBE0129	Transformación de la cepa GBE0129 con el plásmido pKD46
GBE0329	pGBE0096	GBE0129	Transformación de la cepa GBE0129 con el plásmido pGBE0096
GBE0901	$\Delta$ ptsHI::FRT	GBE0129	
GBE0902	$\Delta$ ptsHI::FRT pKD46	GBE0901	Transformación de la cepa GBE0901 con el plásmido pKD46
GBE0903	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aad <sup>+</sup>	GBE0902	
GBE0929	$\Delta$ ptsHI::FRT	GBE0901	Selección de la cepa GBE0901 en medio MS con glucosa como la fuente de carbono.
GBE1000	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aad <sup>+</sup>	GBE0903.	Selección de la cepa GBE0903 en medio MS con glucosa como la fuente de carbono.
GBE1001	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aad <sup>+</sup> pKD46	GBE1000	Transformación de la cepa GBE1000 con el plásmido pKD46
GBE1005_pKD46	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup>	GBE1001	
GBE1005	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup>	GBE1005 pKD46.	Se ha verificado la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1005_P	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup> pCP20	GBE1005	Transformación de la cepa GBE1005 con el plásmido pCP20
GBE1006	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT	GBE1005_p	Se ha verificado la pérdida del plásmido pCP20.
GBE1010	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT pKD46	GBE1006	Transformación de la cepa GBE1006 con el plásmido pKD46
GBE1014_pKD46	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aad <sup>+</sup>	GBE1010	
GBE1014	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aad <sup>+</sup>	GBE1014_pKD46	Se ha verificado la pérdida del plásmido pKD46.

ES 2 554 814 T3

(continuación)

FRT : objetivo de reconocimiento de FLP			
Nombre de cepa	Genotipo	Cepa de origen de la construcción	
GBE1283	$\Delta$ ptsHI::FRT	GBE0929	Cultivos sucesivos de la GBE0929 en medio MS con glucosa como la fuente de carbono.
GBE1284	$\Delta$ ptsHI::FRT pKD46	GBE1283	Transformación de la cepa GBE1283 con el plásmido pKD46
GBE1287	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aac <sup>+</sup>	GBE1284	
GBE1337	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aac <sup>+</sup> pKD46	GBE1287	Transformación de la cepa GBE1287 con el plásmido pKD46
GBE1339	$\Delta$ zwf_edd_eda::aac <sup>+</sup>	GBE0170	
GBE1340	$\Delta$ zwf_edd_eda::aac <sup>+</sup> pKD46	GBE1339	Transformación de la cepa GBE1339 con el plásmido pKD46
GBE1341_pKD46	$\Delta$ zwf_edd_eda::aac <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup>	GBE1340	
GBE1341	$\Delta$ zwf_edd_eda::aac <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup>	GBE1341_pKD46	Se ha verificado la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1341_p	$\Delta$ zwf_edd_eda::aac <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup> pCP20	GBE1341	Transformación de la cepa GBE1341 con el plásmido pCP20
GBE1342	$\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT	GBE1341_p	Se ha verificado la pérdida del plásmido pCP20.
GBE1343	$\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT pKD46	GBE1342	Transformación de la cepa GBE1342 con el plásmido pKD46
GBE1344_pKD46	$\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aac <sup>+</sup>	GBE1343	
GBE1344	$\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aac <sup>+</sup>	GBE1344_pKD46	Se ha verificado la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1345	$\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aac <sup>+</sup> pGBE457 pGBE0096	GBE1344	Transformación de la cepa GBE1344 con ambos plásmidos pGBE96 y pGBE457
GBE1346	pGBE0096	GBE0329	Adaptación de la cepa GBE0329 al medio MS + glucosa (2 g/l) + Cloranfenicol (25 ug/ml)
GBE1347	$\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aac <sup>+</sup> pGBE457 pGBE96	GBE1345	Adaptación de la cepa GBE1345 al medio MS + glucosa (2 g/l) + Cloranfenicol (25 ug/ml)
GBE1348	$\Delta$ ptsHI::FRT pGBE96	GBE0929	Transformación de la cepa GBE0929 con ambos plásmidos pGBE96 y pGBE457
GBE1349	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aac <sup>+</sup> pGBE457 pGBE0096	GBE1014	Transformación de la cepa GBE1014 con ambos plásmidos pGBE96 y pGBE457
GBE1350	$\Delta$ ptsHI::FRT pGBE96	GBE1348	Adaptación de la cepa GBE1348 al medio MS + glucosa (2 g/l) + Cloranfenicol (25 ug/ml)

(continuación)

FRT : objetivo de reconocimiento de FLP			
Nombre de cepa	Genotipo	Cepa de origen de la construcción	
GBE1351	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aad <sup>+</sup> pGBE457 pGBE0096	GBE1349	Adaptación de la cepa GBE1349 al medio MS + glucosa (2g/l) + Cloranfenicol (25 ug/ml)
GBE1353_pKD46	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup>	GBE1337	
GBE1353	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup>	GBE1353_pKD46	Se ha verificado la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1353_p	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup> pCP20	GBE1353	Transformación de la cepa GBE1353 con el plásmido pCP20
GBE1368	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT	GBE1353_P	Se ha verificado la pérdida del plásmido pCP20.
GBE1371	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT pKD46	GBE1368	Transformación de la cepa GBE1368 con el plásmido pKD46
GBE1420_pKD46	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aad <sup>+</sup>	GBE1371	
GBE1420	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf_edd_eda::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aad <sup>+</sup>	GBE1420_pKD46	Se ha verificado la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1433	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf::aad <sup>+</sup>	GBE1284	
GBE1436	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf::aad <sup>+</sup> pKD46	GBE1433	Transformación de la cepa GBE1433 con el plásmido pKD46
GBE1441_pKD46	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup>	GBE1436	
GBE1441	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup>	GBE1441_pKD46	Se ha verificado la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1441_p	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkA::aac <sup>+</sup> pCP20	GBE1441	Transformación de la cepa GBE1441 con el plásmido pCP20
GBE1448	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf::FRT $\Delta$ pfkA::FRT	GBE1441_p	Se ha verificado la pérdida del plásmido pCP20.
GBE1449	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf::FRT $\Delta$ pfkA::FRT pKD46	GBE1448	Transformación de la cepa GBE1448 con el plásmido pKD46
GBE1518_pKD46	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aad <sup>+</sup>	GBE1449	
GBE1518	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ zwf::FRT $\Delta$ pfkA::FRT $\Delta$ pfkB::aad <sup>+</sup>	GBE1518_pKD46	Se ha verificado la pérdida del plásmido pKD46.
GBE2252_pKD46	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ pfkA::aad <sup>+</sup>	GBE1284	
GBE2252	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ pfkA::aad <sup>+</sup>	GBE2252_pKD46	Se ha verificado la pérdida del plásmido pKD46.
GBE2253	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ pfkA::aad <sup>+</sup> pKD46	GBE2252	Transformación de la cepa GBE2252 con el plásmido pKD46
GBE2256_pKD46	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ pfkA::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkB::aac <sup>+</sup>	GBE2253	
GBE2256	$\Delta$ ptsHI::FRT $\Delta$ pfkA::aad <sup>+</sup> $\Delta$ pfkB::aac <sup>+</sup>	GBE2256_pKD46	Se ha verificado la pérdida del plásmido pKD46.

(continuación)

FRT : objetivo de reconocimiento de FLP			
Nombre de cepa	Genotipo	Cepa de origen de la construcción	
GBE2262	F-lambda- ilvG- rfb-50 rph-1 pGB1021	GBE0129	Transformación de la cepa GBE0129 con plásmido pGB1021
GBE2263	$\Delta zwf\_edd\_eda::FRT \Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::aad^+$ pGB1020	GBE1344	Transformación de la cepa GBE1344 con plásmido pGB1020
GBE2264	F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1 pGB1021	GBE2262	Adaptación de la cepa GBE2262 al medio MS + glucosa (2 g/l) + ampicilina (100 ug/ml).
GBE2265	$\Delta zwf\_edd\_eda::FRT \Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::aad^+$ pGB1020	GBE2263	Adaptación de la cepa GBE2263 al medio MS + glucosa (2 g/l) + ampicilina (100 ug/ml).
GBE2266	$\Delta ptsHI::FRT$ pGB1021	GBE1283	Transformación de la cepa GBE1283 con plásmido pGB1021
GBE2267	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf\_edd\_eda::FRT \Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::aad^+$ pGB1020	GBE1420	Transformación de la cepa GBE1420 con plásmido pGB1020
GBE2268	$\Delta ptsHI::FRT$ pGB1021	GBE2266	Adaptación de la cepa GBE2266 al medio MS + glucosa (2 g/l) + ampicilina (100 ug/ml).
GBE2269	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf\_edd\_eda::FRT \Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::aad^+$ pGB1020	GBE2267	Adaptación de la cepa GBE2267 al medio MS + glucosa (2 g/l) + ampicilina (100 ug/ml).
GBE2270	$\Delta ptsHI::FRT \Delta pfkA::aad^+ \Delta pfkB::aac^+$ pGB1020	GBE2256	Transformación de la cepa GBE2256 con plásmido pGB1020
GBE2271	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf::FRT \Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::aad^+$ pGB1020	GBE1518	Transformación de la cepa GBE1518 con plásmido pGB1020
GBE2272	$\Delta ptsHI::FRT \Delta pfkA::aad^+ \Delta pfkB::aac^+$ pGB1020	GBE2270	Adaptación de la cepa GBE2270 al medio MS + glucosa (2 g/l) + ampicilina (100 ug/ml).
GBE2273	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf::FRT \Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::aad^+$ pGB1020	GBE2271	Adaptación de la cepa GBE2266 al medio MS + glucosa (2 g/l) + ampicilina (100 ug/ml).

**TABLA 3: Secuencias de regiones cromosómicas bacterianas, genes usados, regiones de plásmidos**

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Descripción	SEC ID N°
secuencia de nucleótido proveniente de la cepa GBE0901, desde los pares de bases 2531736 hasta 2531870	<b><u>Aggctagactttagttccacaacactaaacctataagttggggaat</u></b> <b><u>acagtgtaggctggagctgcttcaagttcctatacttctagagaata</u></b> <b><u>ggaacttcggaataggaactaaggaggatattcatatg</u></b>	La región FRT está subrayada	SQ 0001

(continuación)

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Descripción	SEC ID N°
Cassette de resistencia a espectinomicina	<p><u>agagcggccgcccaccgcggaagttcctatacttctagagaatag</u>  <u>gaacttcagctgatagaacagaagccactggagcacctcaaaa</u>            acaccatcatacactaaatcagtaagttggcagcatacccgacgc            actttgcgccgaataaatacctgtgacggaagatcacttcgcagaat            aaataaatcctggtgctcctgtgataccgggaagccctgggccaac            tttggcgaaaatgagacgttgatcggcacgtaagaggtccaacttt            caccataatgaaataagatcactaccgggctgatttttgagtatcga            gatttcaggagctaaggaagctacatatgagtgaaaaagtgcccg            ccgagatttcggtgcaactatcacaagcactcaacgtcatcgggcg            ccacttggagtcgacgttctggccgtgcattgtacggctccgact            ggatggcggattgaaaccgtacagtgatattgatttctggtgactgt            agctgcaccgctcaatgatgctgctggcaagccctgctcgtcgtat            ctcttggaggttcagcttccctggccaaaacaaggcactccgctc            ctggaagtgaccatcgtcgtgcacagtgacatcgtaccttggcgta            tccggccaggcgggaactgcagttcggagagtgccagcgcgcaag            acatccttgcgggcatcttcgagcccgccacaaccgattctgacttg            gcgattctgctaacaaggcaagcaacatagcgtcgtcttggcag            gttcagcagcgaaggatctcttcagctcagtcaccagaaagcgatcta            tcaaggcactggccgatactctgaagctatggaactcgcgcccag            attgggcccggcgatgagcggaatgtagtcttacttctcgtatctg            gtacaccgcagcaaccggcaagatcgcgccaaggatgttgcctgc            cacttgggcaatggcagccttgcagctcaacatcagccatcctgt            tgaatgcaagcgggcttcttgggcaagaagaagattattgccc            gctcgtcggatcaggtggcggcgtcattaattcgtgaagtatga            agcagttaaactgcttgggtccagccaataagaagttcctatacttct  <u>agagaataggaacttcgcatqcacqcaqcatatgc</u></p>	Las regiones FRT están subrayadas	SQ 0002
Cassette de resistencia a apramicina	<p><u>agagcggccgcccaccgcggaagttcctatacttctagagaatag</u>  <u>gaacttcgggttcagtgcagctccatcagcaaaaggggatgataa</u>            gttatcaccaccgactatttgaacagtgccgtgatcgtgctatgatc            gactgatgcatcagcgggtggagtcaatgtcgtgcaatacgaatgg            cgaaaagccgagctcatcggtcagcttctcaacctggggttacccc            cggcgggtgctgctggtccacagctcctccgtagcgtccggcccct            cgaagatgggcccacttggactgatcaggccctcgtgctgctgctg            ggtccgggagggacgctcgtcatgccctcgtgggtcaggtctggacg            acgagccgttcgatcctgcccagctcggcgttacaccggaccttggg            gttgtctctgacacattctggcgcctgccaaatgtaaagcgcagcgc            ccatccatttgccttgcggcagcggggccacaggcagagcagatc            atctctgatccattgcccctgccacctcactcgcctgcaagcccggtc            gccogtgcctgaactcgtatgggaggtacttctcctcggcgtggg            acacgatgccaacacgacgctgcatcttgcgagttgatggcaag            gttccctatgggtgcccagacactgcacattcttcaggatggcaa            gttgttacgcgtgatattctcagagaatgaccactgctgtgagcgttt            gccttggcggacaggtggctcaaggagaagagccttcagaagga            aggtccagtcggtcatgccttctcgggtgatccgctcccgcgacatt            gtggcgacagccctgggtcaactgggcccagatccgttgatcttct            gcatccgcccagagggcgggatgcaagaatgcgatccgctcggc  <u>agtcgattggctgagctcatgagcggagaacgagatgacgttggg</u></p>	Las regiones FRT están subrayadas	SQ 0003

ES 2 554 814 T3

(continuación)

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Descripción	SEC ID N°
	ggggcaaggctcgcgctgattgctggggcaacacgtggagcggatc ggggattgtcttcttcagctcgctgatgatgctgacgctcaatgcc <u>gaagttcctatacttctagagaataggaacttcgcatgcacgcagc</u> atatgc		
MCS del plásmido pGB0123	<u>AAGCTT</u> GCGGCCGCGGGGTTAATTAACCTCCT TAGTTTAAACCTAGGCATGCCTCTAGAGGATC CCCGGGTACCGAGCTCGAAttaCCTGCAGGAAT <u>TC</u>	Los sitios de restricción para <i>HindIII</i> y <i>EcoRI</i> están subrayados.	SQ 0004

(continuación)

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Descripción	SEC ID N°
<p>Gen de fosfoetolasa optimizado de <i>Lactococcus lactis</i> flanqueado por sitios de restricción de <i>PacI</i> y <i>NotI</i></p>	<p><u>TTAATTAATGCATCATCACCACCATCACATGAC</u>  CGAATATAACAGCGAAGCCTATCTGAAAAAACT  GGATAAATGGTGGCGTGCAGCAACCTATCTGG  GTGCAGGTATGATTTTTCTGAAAGAAAATCCGC  TGTTTAGCGTTACCGGCACCCCGATTAAAGCA  GAAAATCTGAAAGCCAATCCGATTGGTCATTG  GGGCACCGTTAGCGGTCAGACCTTTCTGTATG  CACATGCAAATCGCCTGATTAACAAATATAACC  AGAAAATGTTTTATATGGGTGGTCCGGGTCAT  GGTGGTCAGGCAATGGTTGTTCCGAGCTATCT  GGATGGTAGCTATACCGAAGCATATCCGAAA  TTACCCAGGATCTGGAAGGTATGAGCCGTCG  TTAAACGTTTTAGCTTTCCGGGTGGTATTGGT  AGCCACATGACCGCACAGACACCGGGTAGCC  TGCATGAAGGTGGTGAAGTGGGTTATGTTCTG  AGCCATGCAACCGGTGCAATTCTGGATCAGCC  GGAACAAATTGCATTTGCAGTTGTTGGTGATG  GTGAAGCAGAAACCGGTCCGCTGATGACCAG  CTGGCATAGCATCAAATTTATCAACCCGAAAA  CGATGGTGCCATTCTGCCGATTCTGGATCTGA  ATGGCTTTAAAATCAGCAATCCGACCCTGTTTG  CACGTACCAGTGATGTTGATATCCGCAAATTTT  TCGAAGGTCTGGGTTATAGTCCGCGTTATATT  GAAAACGATGACATCCATGACTACATGGCCTA  TCATAAACTGGCAGCAGAAGTTTTTGACAAAG  CCATTGAAGATATCCATCAGATTCAGAAAAGATG  CCCGTGAAGATAATCGCTATCAGAATGGTGAA  ATTCCGGCATGGCCGATTGTTATTGCACGTCT  GCCGAAAGGTTGGGGTGGTCCTCGTTATAATG  ATTGGAGCGGTCCGAAATTTGATGGTAAAGGT  ATGCCGATCGAACATAGCTTTCGTGCACATCA  GGTCCGCTGCCGCTGAGCAGCAAAAACATG  GGCACCCCTGCCGGAATTTGTTAAATGGATGAC  CAGCTATCAGCCGGAACCCTGTTTAATGCAG  ATGGTAGCCTGAAAGAAGAAGTGCAGGATTTT  GCACCGAAAGGTGAAATGCGTATGGCAAGCAA  TCCGTTACCAATGGTGGTGGTATTGATTATAGCA  ATCTGGTTCTGCCGATTGGCAAGAATTTGCA  AATCCGATTAGCGAAAACAATCGTGGTAAACT  GCTGCCGGATACCAATGATAATATGGATATGA  ACGTGCTGAGCAAATATTTGCCGAAATTGTTA  AACTGAACCCGACCCGTTTTCGTCTGTTTGGT  CCGGATGAAACCATGAGCAATCGTTTTTGGGA  GATGTTTAAAGTGACCAATCGTCAGTGGATGC  AGGTTATCAAAAATCCGAACGATGAGTTTATTA  GTCCGGAAGGTGCGCATTATTGATAGCCAGCTG</p>	<p>Los sitios de restricción para <i>PacI</i> y <i>NotI</i> están subrayados.</p>	<p>SQ 0005</p>

(continuación)

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Descripción	SEC ID N°
	<p>AGCGAACATCAGGCAGAAGGTTGGCTGGAAG                      GTTATACCCTGACCGGTCGTACCGGTGTTTT                      GCAAGCTATGAAAGTTTTCTGCGTGTTGTTGAT                      AGCATGCTGACCCAGCACTTTAAATGGATTCTG                      TCAGGCAGCAGATCAGAAATGGCGTCATGATT                      ATCCGAGCCTGAATGTTATTAGCACCAGCACC                      GTTTTTCAGCAGGATCATAATGGTTATACCCAT                      CAAGATCCGGGTATGCTGACCCATCTGGCAGA                      GAAAAAAGCGATTTTATTCGTCAGTATCTGCC                      TGCAGATGGTAATACCCTGCTGGCCGTTTTTG                      ATCGTGCAATTCAGGATCGCAGCAAAATTAAC                      CATATTGTTGCAAGCAAACAGCCTCGTCAGCA                      GTGGTTTACCAAAGAAGAAGCAGAAAAACTGG                      CCACCGATGGTATTGCAACCATTGATTGGGCA                      AGCACCGCAAAAGATGGTGAAGCCGTTGATCT                      GGTTTTTGCAAGTGCCGGTGCAGAACCGACCA                      TTGAAACCCTGGCAGCACTGCATCTGGTTAAT                      GAAGTTTTCCGCAGGCCAAATTCGCTATGTT                      AATGTTGTTGAACTGGGTCGTCTGCAGAAAA                      GAAAGGTGCACTGAATCAAGAACGCGAACTGA                      GTGATGAAGAGTTCGAAAAATACTTTGGTCCG                      AGCGGTACACCGGTTATTTTTGGTTTTCATGGC                      TATGAAGATCTGATCGAGAGCATCTTTATCAG                      CGTGGTCATGATGGTCTGATTGTTTCATGGTTAT                      CGTGAAGATGGTGATATTACCACCACCTATGA                      TATGCGTGTTTATAGCGAACTGGATCGTTTTCA                      TCAGGCAATTGATGCAATGCAGGTTCTGTATG                      TGAATCGTAAAGTTAATCAGGGTCTGGCCAAA                      GCATTTATTGATCGTATGGAACGTACCCTGGT                      GAAACATTTGAAGTTACCCGTAATGAAGGCG                      TTGATATTCCGGAATTTACCGAATGGGTTTGA                      GCGATCTGAAAAAGTAATGAGCGGCCGC</p>		
MCS del plásmido pGB0124	<p><u>GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAG</u>                      AGGCATGCCTAGGTTTAAACTAAGGAGGTTAA                      TTAACCCCGCGGCCGCAAGCTT</p>		SQ 0006

TABLA 4 Secuencia de cebador

Nombre	Secuencia	Descripción	SEC ID N°:
0635	Ggtcaattctcttagcggc	Cebador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye los genes <i>ptsHI</i>	RC0001
0638	Ccgcaaaaacgacatccggcacg	Cebador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye los genes <i>ptsHI</i>	RC0002

(continuación)

Nombre	Secuencia	Descripción	SEC ID N°:
0633	caagtataccctggcttaagtaccgggtagttaa cctaaggagaatgacAGAGCGGCCGCC ACCGCGGG	Cebador para supresión de los genes <i>zwf_edd_eda</i>	RC0003
0634	gcaaaaaaacgctacaaaaatgccgatcctc gatcgggcattttgacttGCATATGCTGCG TGCATGCG	Cebador para supresión de los genes <i>zwf_edd_eda</i>	RC0004
1036	Ccgcaattgocgctttccc	Cebador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye los genes <i>zwf_edd_eda</i>	RC0005
1037	Ggtg atttcagtg aggtctccc	Cebador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye los genes <i>zwf_edd_eda</i>	RC0006
0629	agacttccggcaacagatttcatttgcattcaa agttcagaggtagtcAGAGCGGCCGCC ACCGCGGG	Cebador para supresión del gen <i>pfkA</i>	RC0007
0630	gcttctgtcatcggttcagggtaaaggaatctgc cttttccgaaatcaGCATATGCTGCGTG CATGCG	Cebador para supresión del gen <i>pfkA</i>	RC0008
0619	Ggocgtcacgatcttcgacgcggc	Cebador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye el gen <i>pfkA</i>	RC0009
0620	Ccgccatattgctgacaaagtgcgc	Cebador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye el gen <i>pfkA</i>	RC0010
0631	actttccgctgattcgggtccagactgaaatcagc ctataggaggaaatgAGAGCGGCCGCC ACCGCGGG	Cebador para supresión del gen <i>pfkB</i>	RC0011
0632	gftgocgacaggttggtgatgattccccaatgct gggggaatgttttGCATATGCTGCGT GCATGCG	Cebador para supresión del gen <i>pfkB</i>	RC0012
0621	Ccacagcgaccaggcagtggtgtgtcc	Cebador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye el gen <i>pfkB</i> .	RC0013
0622	Gcactttggtaagcccgaacc	Cebador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye el gen <i>pfkB</i> .	RC0014
pUC1 8_24 6	Ccattcaggctgcgaactg	Cebador para determinar la secuencia del gen de fosfoacetolasa proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> clonado en el pGB0123.	RC0015
pUC1 8_38 00_rev	Gcgcggtggccgattcattaatgc	Cebador para determinar la secuencia del gen de fosfoacetolasa proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> clonado en el pGB0123.	RC0016

(continuación)

Nombre	Secuencia	Descripción	SEC ID N°:
Pkt lacto_700_dir	CAATCCGACCCTGTTTGCACGTA C	Cebador para determinar la secuencia del gen de fosfoacetolasa proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> clonado en el pGB0123.	RC0017
Pkt_lacto_mil_dir	GCTGCCGGATACCAATGATAATA TGG	Cebador para determinar la secuencia del gen de fosfoacetolasa proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> clonado en el pGB0123.	RC0018
Pkt_lacto_mil_rev	CCATATTATCATTGGTATCCGGCA GC	Cebador para determinar la secuencia del gen de fosfoacetolasa proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> clonado en el pGB0123.	RC0019
0070	CCCGGGGGATCCAGAATTTAAAA GGAGGGATT	Cebador para amplificar los genes <i>ctfA</i> y <i>ctfB</i> provenientes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824.	RC0020
0071	CTCGAGGATATCAAGAATTCTTTT TAAACAGCCATGGGTC	Cebador para amplificar los genes <i>ctfA</i> y <i>ctfB</i> provenientes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824.	RC0021
1066	TGTA AACGACGGCCAGT	Cebador general para determinación de secuencia	RC0022
1067	CAGGAAACAGCTATGACC	Cebador general para determinación de secuencia	RC0023
0072	CTCGAGGATATCAGGAAGGTGAC TTTTATGTTAAAGG	Cebador para amplificar el gen <i>adc</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824.	RC0024
0073	GCATGCGTCGACATTA AAAAAATA AGAGTTACC	Cebador para amplificar el gen <i>adc</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824.	RC0025
1068	CCTCACGGCAAAGTCTCAAGC	Cebador para determinar la secuencia de los genes <i>ctfA</i> y <i>ctfB</i>	RC0026
1069	GCCATGGGTCTAAGTTCATTGG	Cebador para determinar la secuencia de los genes <i>ctfA</i> y <i>ctfB</i>	RC0027
0074	CATGATTTTAAGGGGGGTACCAT ATGCATAAGTTTAA	Cebador para amplificar el gen <i>thl</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824	RC0028
0075	GTTATTTTAAAGGATCCTTTT TAG CACTTTTCTAGC	Cebador para amplificar el gen <i>thl</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824	RC0029
1070	GGCAGAAAGGGAGAACTGTAG	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0030
1071	TGGAAAGAATACGTGCAGGCGG	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0031
1072	GATTACGCCAAGCTTGCATGCC	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0032
1073	CCGGCCTCATCTACAATACTACC	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0033

(continuación)

Nombre	Secuencia	Descripción	SEC ID N°:
1074	CCCATTATTGCTGGGTCAACTCC	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0034
1516	CCCGGTACCTCATTACTTTTTTCAG ATCGCTCCAAACCC	Cebador para amplificar el gen de fosfoacetolasa (YP_003354041.1) proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> .	RC0035
1517	GGGGAATTCAGGAGGTGTACTAG ATGCATCATCACCACCATCACAT GACC	Cebador para amplificar el gen de fosfoacetolasa (YP_003354041.1) proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> .	RC0036
1994	CCATAGCTCCACCCATACCAGAG AGC	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0037
1995	GCTATTATTACGTCAGCATCTCCT GC	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0038
1996	GCAGGCGAAGTTAATGGCGTGC	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0039
1997	GATACGGGGTAACAGATAAACCA TTTC	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0040
1998	CCCTTTCTGCCTTTAATTACTACA GG	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0041
1999	GCATCAGGATTAATGACTGTGC AGC	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0042
2000	GGACTAGCGCCATTCCAACAT TCC	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0043
2001	GCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGT AACGCC	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0044
2002	GCATTGCGTGTACAAGAGTAACG AG	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0045
2003	CCTGTCCAAGCTTCATGTACGG	Cebador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0046
1109	GCGCAAGATCATGTTACCGGTAA AATAACCATAAAGGATAAGCGCA GATAGCATATGCTGCGTGCATGC G	Cebador para supresión del gen zwf.	RC0047
1110	CGCCTGTAACCGGAGCTCATAGG G	Cebador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye el gen zwf.	RC0048

Integración cromosómica para expresiones suprimidas de gen

Para integrar el ADN en una región específica del cromosoma, se requieren homología del ADN que se inserta al sitio cromosómico elegido como blanco y un marcador seleccionable. Es conveniente que el marcador se puede

retirar fácilmente después de la integración. El sistema de FRT/Flp recombinasa proporciona un mecanismo para retirar el marcador. Los sitios FRT son sitios de reconocimiento para las Flp recombinasas. Flp es una recombinasa específica de sitio, la cual corta el ADN intercalado de los sitios de reconocimiento repetidos directamente.

- 5 El casete de integración que contiene los brazos homólogos para el sitio cromosómico elegido como blanco y que codifica un marcador seleccionable flanqueado por sitios FRT (Datsenko KA. y Wanner BL, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, N° 12, pp. 6640-6645) se transformó en las células objetivo que alojan a pKD46 (Datsenko KA. y Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, N° 12, pp. 6640-6645). Los integrantes exitosos se seleccionan cultivando las células en presencia del antibiótico. Posteriormente, pKD46 se cura a partir de las células y el plásmido de recombinasa se introduce después en los  
10 integrantes para remoción del gen de antibiótico. Las cepas que contienen un casete de FRT se transformaron con el plásmido pCP20 que codifica Flp recombinasa (Datsenko KA. y Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, N° 12, pp. 6640-6645). Después de la remoción del marcador integrado, los plásmidos de recombinasa se curan a partir de la cepa.

#### EJEMPLO 1: Construcción de la cepa GBE1014

- 15 La finalidad de esta sección es describir la construcción de una cepa de *Escherichia coli*, denominada GBE1014, para lo cual la absorción de glucosa dependiente de PEP se inactiva mediante supresión de los genes de transporte de PTS, se habilita la absorción de glucosa dependiente de ATP, la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) se inactiva mediante supresión de los genes de la fosfofructoquinasa, y la ruta de fosfato de pentosa (PPP) se inactiva mediante supresión del gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La construcción comienza con la cepa  
20 GBE0901. GBE0901 es una cepa de *Escherichia coli*, (Migula) Castellani y Chalmers, MG1655 (ATCC N° 700926) en la que la secuencia de nucleótido original, desde el pb 2531736 hasta 2533865 (base de datos de genoma del NCBI), incluye los genes *ptsH* y *ptsI*, se reemplaza con SEC SQ0001. Esta supresión afecta al sistema de fosfotransferasa dependiente de PEP (PTS), lo que da como resultado que la absorción de glucosa dependiente de PEP se inactive en la cepa GBE0901. La supresión de los genes *ptsHI* se verifica mediante PCR y los  
25 oligonucleótidos 0635 y 0638 (dados como SEC RC0001 y RC0002, respectivamente) se usan como cebadores. El producto de PCR de 0,4 Kpb resultante se sometió a determinación de secuencia usando los mismos cebadores.

- La cepa GBE0901 se cultivó en medio LB y las células GBE0901 se hicieron electrocompetentes. Las células GBE0901 electrocompetentes se transformaron con un plásmido denominado pKD46 (Datsenko KA. y Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, N° 12, pp. 6640-6645) y después se sembraron en  
30 placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C. La transformación de las células GBE0901 con el plásmido pKD46 generó la cepa GBE0902. El plásmido pGBE0688 presenta un gen de resistencia a espectinomicina colocado bajo el control de su propio promotor. La secuencia de este casete de resistencia se indica en la Tabla 3 (SEC SQ0002).

- El plásmido pGBE0688 se usó como un molde con los cebadores 0633 y 0634 (dados como SEC RC0003 y RC0004, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1,3 Kpb. Este producto de PCR de 1,3 Kpb se transformó en bacterias GBE0902 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró después en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml) y se incubó durante toda la noche a 37 °C para generar la cepa GBE0903. En la cepa GBE0903 se eliminó la secuencia de ADN constituida por los genes *zwf*, *edd*, y *eda*. Estos genes codifican respectivamente para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una 6-fosfogluconato deshidratasa, y una 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa. Esta secuencia de ADN eliminada que incluye los genes *zwf*, *edd*, y *eda* se reemplazó por un casete de resistencia a espectinomicina. Con el fin de confirmar la supresión eficaz de los genes *zwf*, *edd*, y *eda*, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 1036 y 1037 (dados como SEC RC0005 y RC0006, respectivamente). Se obtuvo un producto de PCR final de 1,9 Kpb. Este producto de PCR de 1,9 Kpb se sometió a determinación de secuencia con los mismos cebadores 1036 y 1037.

- 45 La cepa GBE0903 se sembró después en placas LB, se incubó a 37 °C y las colonias aisladas se sometieron a identificación sistemática en placas MS (Richaud C, Mengin-Leucreux D., Pochet S., Johnson EJ., Cohen GN. y Marliere P; The Journal of Biological Chemistry; 1993; Vol. 268; N° 36; pp. 26827-26835) con glucosa como la fuente de carbono (2 g/l). Después de 48 horas de incubación a 37 °C, las colonias se volvieron visibles y se transfirieron a un medio líquido MS suministrado con glucosa (2 g/l). Esta incubación durante la noche a 37 °C indujo la pérdida del plásmido pKD46. Un aislado tenía un tiempo de duplicación de 7 horas y se denominó GBE1000.

La cepa GBE1000 se hizo electrocompetente. Las células GBE1000 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pKD46, y después se sembraron en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C. La transformación de las células GBE1000 con el plásmido pKD46 generó la cepa GBE1001.

- 55 El plásmido pGBE0687 presenta un gen de resistencia a apramicina colocado bajo el control de su propio promotor. La secuencia de este casete de resistencia se indica en la Tabla 3 (SEC SQ0003).

El plásmido pGBE0687 se usó como un molde junto con los cebadores 0629 y 0630 (dados como SEC RC0007 y RC0008, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1,2 Kpb. El producto de PCR de 1,2 Kpb resultante

se transformó en bacterias GBE1001 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que contenían apramicina (50 ug/ml). Las placas se incubaron después durante la noche a 37 °C para generar una nueva cepa denominada GBE1005\_pKD46. En la cepa GBE1005\_pKD46 el gen de fosfofructoquinasa *pfkA*, se eliminó y se reemplazó por el casete de resistencia a apramicina. Para confirmar que se producía la supresión del gen *pfkA*, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 0619 y 0620 (dados como SEC RC0009 y RC0010, respectivamente). Este producto de PCR de 1,7 Kpb se sometió a determinación de secuencia con los mismos cebadores 0619 y 0620. Con el fin de confirmar la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1005\_pKD46 se sembró en placas LB y se incubó durante toda la noche a 42 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se verificó sembrando las colonias aisladas en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37 °C y se denominó GBE1005. Las células GBE1005 no crecieron en las placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

El casete de espectinomicina estaba localizado en los loci correspondientes de los genes *zwf\_edd\_eda* y el casete de apramicina estaba localizado en los loci correspondientes de los genes *pfkA*. Con el fin de cortar los casetes resistentes que contenían los genes de resistencia a espectinomicina y apramicina, la cepa GBE1005 se transformó con el plásmido pCP20 (Datsenko KA. y Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, N° 12, pp. 6640-6645) para obtener la cepa GBE1005\_p. Después de incubar durante toda la noche en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) a 30 °C, las colonias aisladas se volvieron a sembrar por estrías en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) y se incubaron durante toda la noche a 30 °C. Las colonias aisladas se sembraron después en placas LB y se incubaron durante toda la noche a 42 °C lo cual causó la pérdida del plásmido pCP20. Después, con el fin de confirmar el corte efectivo de los dos casetes resistentes y la pérdida del plásmido pCP20, las colonias aisladas se volvieron a sembrar por estrías en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37 °C, en placas LB que contenían apramicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37 °C, en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C y en placas LB, incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37 °C y se denominó GBE1006. Las células GBE1006 no crecían en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml), en placas LB que contenían apramicina (50 ug/ml), y en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

La cepa GBE1006 se hizo electrocompetente, y las células GBE1006 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pKD46. Las células transformantes se sembraron después en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incubaron durante la noche a 30 °C para obtener una nueva cepa denominada GBE1010. Se generó un producto de PCR usando el plásmido pGBE0688 como un molde y los oligonucleótidos 0631 y 0632 (dados como SEC RC0011 y RC0012, respectivamente) como cebadores. El producto de PCR de 1,3 Kpb resultante se transformó en bacterias GBE1010 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C para generar la cepa GBE1014\_pKD46. En la cepa GBE1014\_pKD46 el gen de fosfofructoquinasa *pfkB*, se eliminó y la secuencia de ADN eliminada se reemplazó con un casete que contiene el gen de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que se producía la supresión del gen *pfkB*, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 0621 y 0622 (dados como SEC RC0013 y RC0014, respectivamente). Este producto de PCR de 2,2 Kpb final se sometió a determinación de secuencia usando los mismos cebadores 0621 y 0622.

Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1014\_pKD46 se sembró en placas LB y las placas se incubaron durante la noche a 42 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirmó sembrando las colonias aisladas en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml), se incubaron durante la noche a 30 °C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante que crecía en placas LB incubadas a 37 °C se denominó GBE1014. Las células GBE1014 no crecían en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

#### 45 EJEMPLO 2: Construcción de la cepa GBE0929

La cepa GBE0901 se sembró en placas LB a 37 °C y las colonias aisladas se sometieron a identificación sistemática en placas MS con glucosa como la fuente de carbono (2 g/l). Después de 48 horas de incubación a 37 °C, las colonias se volvieron visibles. Un aislado tenía un tiempo de duplicación de 5 horas y se denominó GBE0929.

#### EJEMPLO 3: Construcción de la cepa GBE1344

50 La construcción comenzó con la cepa denominada GBE0129. GBE0129 es una bacteria *Escherichia coli* MG1655 (ATCC N° 700926).

La cepa GBE0129 se cultiva en medio LB y las células GBE0129 se hicieron electrocompetentes. Las células GBE0129 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pKD46, y después los transformantes se sembraron en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C para generar una nueva cepa denominada GBE0170.

Se generó un producto de PCR usando el plásmido pGBE0687 como un molde y los oligonucleótidos 0633 y 0634 (dados como SEC RC0003 y RC0004, respectivamente) como cebadores. El producto de PCR de 1,2 Kpb resultante se transformó en bacterias GBE0170 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que

5 contenían apramicina (50 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Esta incubación provocó la pérdida del plásmido pKD46 y llevó a la creación de una nueva cepa denominada GBE1339. En la cepa GBE1339 la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa codificada por el gen *zwf*, la 6-fosfogluconato deshidratasa codificada por el gen *edd* y la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa codificada por el gen *eda* eran inactivas. Los genes secuenciales *zwf*, *edd*, y *eda* se eliminaron y reemplazaron con un casete que contiene el gen de resistencia a apramicina. Para confirmar que la supresión de los genes *zwf*, *edd*, y *eda* era eficaz, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 1036 y 1037 (dados como SEC RC0005 y RC0006, respectivamente). Este producto de PCR de 1,8 Kpb se sometió a determinación de secuencia con los mismos cebadores 1036 y 1037.

10 La cepa GBE1339 se hizo electrocompetente, y las células GBE1339 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pKD46. Los transformantes se sembraron después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C para generar la cepa GBE1340. Se realizó un producto de PCR usando el plásmido pGBE0688 como un molde y los oligonucleótidos 0629 y 0630 (dados como SEC RC0007 y RC0008, respectivamente) como cebadores. El producto de PCR de 1,3 Kpb resultante se transformó en bacterias GBE1340 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C para generar la cepa GBE1341\_pKD46. En la cepa GB1341\_pKD46 el gen *pfka* que codifica una fosfofructoquinasa es reemplazado por el gen de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que la supresión del gen *pfka* era eficaz, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 0619 y 0620 (dados como SEC RC0009 y RC0010, respectivamente). Este producto de PCR de 1,8 Kpb se sometió a determinación de secuencia con los mismos cebadores 0619 y 0620. Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46 para la cepa GBE1341\_pKD46, las células GBE1341\_pKD46 se sembraron en placas LB y se incubaron a 42 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se verificó sembrando las colonias aisladas en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C y en placas LB incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante que crecía en placas LB incubadas a 37 °C era GBE1341. GBE1341 no crecía en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

25 Con el fin de cortar los casetes resistentes que contenían los genes de resistencia a apramicina y espectinomicina, los cuales están respectivamente localizados en los loci anteriores de los genes *zwf\_edd\_eda* y *pfka*, la cepa GBE1341 se transformó con el plásmido pCP20 para obtener una nueva cepa denominada GBE1341\_p. Después de incubar durante toda la noche en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) a 30 °C, las colonias aisladas se volvieron a sembrar por estrías en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) para otra incubación durante la noche a 30 °C. Las colonias aisladas se sembraron después en placas LB y se incubaron durante toda la noche a 42 °C. Esta incubación a 42 °C provocó la pérdida del plásmido pCP20. Eventualmente con el fin de confirmar el corte de los dos casetes resistentes y la pérdida del plásmido pCP20, las colonias aisladas se volvieron a sembrar por estrías en placas LB que contenían espectinomicina (50ug/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C, en placas LB suministradas con apramicina (50 ug/ml) e incubadas durante toda la noche a 37 °C, en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) e incubadas durante toda la noche a 30 °C y en placas LB incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa generada que crecía en placas LB incubadas a 37 °C se denominó GBE1342. Las células GBE1342 no crecían en placas LB suministradas con espectinomicina (50 ug/ml), en placas LB suministradas con apramicina (50 ug/ml) y en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml).

40 La cepa GBE1342 se hizo electrocompetente, y las células GBE1342 se transformaron con el plásmido pKD46. Los transformantes se sembraron después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) y se incubaron durante toda la noche a 30 °C para obtener la cepa GBE1343. Se realizó un producto de PCR y se usó el plásmido pGBE0688 como un molde y los oligonucleótidos 0631 y 0632 (dados como SEC RC0011 y RC0012, respectivamente) como cebadores. El producto de PCR de 1,3 Kpb resultante se transformó en bacterias GBE1343 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml) seguido por una incubación durante la noche a 37 °C. Se generó una nueva cepa y se denominó GBE1344\_pKD46. En la cepa GBE1344\_pKD46 el gen *pfkb* que codifica una fosfofructoquinasa se eliminó y se reemplazó con el casete de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que la supresión del gen *pfkb* era eficaz, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 0621 y 0622 (dados como SEC RC0013 y RC0014, respectivamente). El producto de PCR de 2,2 Kpb obtenido se sometió a determinación de secuencia con los mismos cebadores 0621 y 0622.

55 Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1344\_pKD46 se sembró en placas LB y se incubó durante toda la noche a 42 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirmó sembrando las colonias aisladas en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) y se incubaron durante toda la noche a 30 °C y en placas LB incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa generada que crecía en placas LB incubadas a 37 °C se denominó GBE1344. Las células GBE1344 no crecían en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml).

#### EJEMPLO 4: Construcción del plásmido pGBE0457

La finalidad de esta sección es describir la construcción de un plásmido que permita la expresión de la fosfocetolasa YP\_003354041.1 proveniente de *Lactococcus lactis* en cepas de *E. coli*.

60 El plásmido pGBE0123 es una versión modificada del plásmido pUC18 (New England Biolabs) y contiene un Sitio de Clonación Múltiple (MCS) modificado. El MCS original de pUC18 (del sitio de restricción *Hind*III hasta el sitio de

restricción *EcoRI*) se reemplaza con la secuencia SQ0004 (Tabla 3). El plásmido pGB0123 permite la expresión de dos proteínas recombinantes bajo el control del promotor Plac.

ID del gen de fosfocetolasa	ID de la proteína fosfocetolasa	Organismo de origen	Plásmido de GeneArt® (Invitrogen) pGBE0421
8679043	YP_003354041.1 <i>lactis</i>	<i>Lactococcus subesp. lactis</i> KF147	

5 El gen de fosfocetolasa de *L. lactis* se optimizó en cuanto a codón por GeneArt® (Invitrogen) para expresión óptima en *Escherichia coli*. Además, se añadió una marca His en la posición 5' del gen y se añadió un codón de detención adicional en la posición 3' (SQ0005). La construcción de gen está flanqueada por los sitios de restricción *PacI* y *NotI* y proporcionado dentro del plásmido pGBE0421.

Para el experimento de clonación, los productos de PCR y los fragmentos de restricción se purificaron en gel usando el kit para extracción en gel QIAquick (Qiagen). Las enzimas de restricción y la ADN ligasa T4 (New England Biolabs. Beverly, MA) se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

10 El plásmido pGBE0421 se digirió con las enzimas de restricción *PacI* y *NotI* para crear un producto de 2,6 Kpb. El plásmido pGB0123 se digirió también con enzimas de restricción, *PacI* y *NotI* y se ligó al fragmento de restricción de 2,6 Kpb. El plásmido resultante (pGBE0457) se sometió a determinación de secuencia con los cebadores 1061, 1062, 1063, 1064 y 1065 (dados como SEC RC0015, RC0016, RC0017, RC0018 y RC0019 respectivamente).

15 La expresión de la fosfocetolasa proveniente de *Lactococcus lactis* se confirmó en un gel de proteína, después de purificar la proteína recombinante usando una trampa de His (kit Protino Ni-IDA 1000, Macherey Nagel). La purificación se procesó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ensayo enzimático, con enzima purificada, también se realizó con el fin de detectar la actividad de fosfocetolasa en dos sustratos diferentes: xilulosa-5-fosfato y fructosa-6-fosfato. El procedimiento experimental es el mismo que el usado por Leo Meile y col., (Journal of Bacteriology, Mayo de 2001, p.2929-2936), excepto que el pH de la solución es 7,5 y se agrega 1 mM de MgCl<sub>2</sub>.  
20 Para este ensayo enzimático, se añadieron 10 µg de proteína purificada a los 75 µl de la reacción. La actividad específica (µmoles de acetil-P formado/minuto/mg de proteína) fue de 2815 µmoles/minuto/mg de proteína y 1941 µmoles/minuto/mg de proteína para D-xilulosa-5-fosfato y D-fructosa-6-fosfato, respectivamente.

#### EJEMPLO 5: Construcción del plásmido pGBE0096

25 La construcción de los plásmidos responsables de la producción de acetona en *E. coli* se basó en la construcción de plásmido descrita en Bermejo LL, Welker NE. y Papoutsakis ET., Applied and Environmental Microbiology, 1998. Vol. 64, Nº 3, pp. 1076-1085.

30 Se encargó la cepa *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824). El ADN genómico de esta cepa está constituido por un cromosoma bacteriano y un plásmido denominado pSOL1. Los genes *ctfA* y *ctfB* se amplificaron mediante PCR a partir del plásmido pSOL1 con los cebadores 0070 y 0071 (dados como SEC RC0020 y RC0021, respectivamente).  
Se introdujeron un sitio de restricción *BamHI* en el extremo 5' del producto de PCR y un sitio de restricción *EcoRV* en el extremo 3' del producto de PCR. El producto de PCR de 1,3 Kpb resultante se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRV*, después se ligó con el pGB0689 (fagémidos pBluescript II, Agilent Technologies) el cual se digirió también con las enzimas de restricción, *BamHI* y *EcoRV*. El plásmido resultante (pGBE0690) se sometió a determinación de secuencia con los cebadores 1066 y 1067 (dados como SEC RC0022 y RC0023, respectivamente).  
35

40 El gen *adc* y el terminador de gen se amplificaron mediante PCR a partir del plásmido pSOL1 con los cebadores 0072 y 0073 (dados como SEC RC0024 y RC0025, respectivamente). La amplificación mediante PCR permitió insertar un sitio de restricción *EcoRV* en el extremo 5' y un sitio de restricción *SalI* en el extremo 3'. El producto de PCR de 0,8 Kpb resultante se digirió con las enzimas de restricción *EcoRV* y *SalI*. El plásmido pGBE0690 se digirió también con las enzimas de restricción, *EcoRV* y *SalI* y después se ligó con el producto de PCR de 0,8 Kpb. El plásmido resultante (pGBE0691) se sometió a determinación de secuencia con los cebadores 1066, 1067, 1068 y 1069 (dados como SEC RC0022, RC0023, RC0026 y RC0027, respectivamente).

45 El plásmido pGBE0691 se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *SalI* para crear un producto de 2,2 Kpb. El fragmento de restricción de 2,2 Kpb contenía los genes *ctfA*, *ctfB* y *adc*. El plásmido pGBE0051 (pUC19, New England Biolabs) se digirió también con las enzimas de restricción, *BamHI* y *SalI* y después se ligó con el fragmento de restricción de 2,2 Kpb. El plásmido resultante (pGBE0692) se sometió a determinación de secuencia con los cebadores 1066, 1067, 1068 y 1069 (dados como SEC RC0022, RC0023, RC0026 y RC0027, respectivamente).

50 El gen *thl* y su promotor *thl* correspondiente proveniente del ADN genómico de *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) se amplificaron mediante PCR con los cebadores 0074 y 0075 (dados como SEC RC0028 y RC0029, respectivamente). La amplificación mediante PCR permitió insertar un sitio de restricción *KpnI* en el extremo 5' y un sitio de restricción *BamHI* en el extremo 3'. El producto de PCR de 1,4 Kpb resultante se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI*, y de igual manera para el plásmido pGBE0692. El plásmido pGBE0692 digerido se ligó con

el producto de PCR de 1,4 Kpb. El plásmido resultante, pGBE0693, se sometió a determinación de secuencia con los cebadores 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073 y 1074 (dados como SEC RC0022, RC0023, RC0026 RC0027, RC0030, RC0031, RC0032, RC0033 y RC0034, respectivamente).

5 El plásmido pGBE0124 es una versión modificada del plásmido pSU18 (Borja Bartolomé, Yolanda Jubete, Eduardo Martínez y Fernando de la Cruz, Gene, 1991, Vol. 102, Fascículo 1, pp. 75-78) y éste contiene un Sitio de Clonación Múltiple (MCS) modificado. El MCS original de pSU18 (desde el sitio de restricción *EcoRI* hasta el sitio de restricción *HindIII*) se reemplazó con la secuencia SEC SQ0006 (Tabla 3). El plásmido pGB0124 permite la expresión de dos proteínas recombinantes bajo el control del promotor Plac. El plásmido pGBE0693 se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *SalI* para crear un producto de 3,5 Kpb. El plásmido pGBE0124 se digirió también con las enzimas de restricción *KpnI* y *SalI*, y después se ligó al fragmento de restricción de 3,5 Kpb. El plásmido resultante (pGBE0096) se sometió a determinación de secuencia con los cebadores 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073 y 1074 (dados como SEC RC0022, RC0023, RC0026 RC0027, RC0030, RC0031, RC0032, RC0033 y RC0034, respectivamente).

#### **EJEMPLO 6: Producción de acetona por las cepas GBE1346 y GBE1347**

##### 15 *Descripción de la transformación del plásmido en cepas relevantes*

La cepa GBE0129 se hizo electrocompetente, y las células GBE0129 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pGBE0096. Los transformantes se sembraron después en placas LB que contenían cloranfenicol (25 ug/ml) y las placas se incubaron durante la noche a 30 °C para generar la cepa GBE0329.

20 La cepa GBE1344 se hizo electrocompetente, y las células GBE1344 electrocompetentes se transformaron con ambos plásmidos pGBE0457 y pGBE0096. Los transformantes se sembraron después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) y cloranfenicol (25 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C para obtener la cepa GBE1345.

25 Las colonias aisladas provenientes de las cepas GBE0329 y GBE1345 se sometieron a identificación sistemática en placas MS que contenían glucosa como la fuente de carbono (2 g/l) y cloranfenicol (25 ug/ml). Estas placas se incubaron a 30 °C para obtener las cepas GBE1346 y GBE1347 respectivamente. Después de 4 días de incubación a 30 °C, las colonias se transfirieron a medio MS líquido que contenía glucosa (2 g/l) y cloranfenicol (25 ug/ml) y se incubaron 3 días a 30 °C.

##### *Descripción de las condiciones de los matraces*

30 Para los experimentos de fermentación, se usó un medio MS con 200 mM de fosfato dipotásico en lugar de fosfato dipotásico 50 mM. El medio resultante se denominó MSP.

35 Se inocularon 400 ml de medio MSP líquido que contenía glucosa (10 g/l) y cloranfenicol (25 ug/ml), ya sea con pre-cultivo de la cepa GBE1346 o con pre-cultivo de la cepa GBE1347. La  $DO_{600}$  inicial era 0,1. Los 400 ml de cultivo se incubaron en frascos de 500 ml, sellados con una tapa roscada, a 30 °C, 70 rpm de velocidad. Se tomaron alícuotas de 2 ml después de 1 día, 2 días, 3 días, 6 días, 7 días y 8 días. Para las muestras de cada alícuota, los frascos se abrieron durante 10 segundos.

##### *Descripción de procedimientos analíticos*

40 Las alícuotas se filtraron y se determinó la concentración de glucosa con el kit de ensayo para glucosa (HK) (GAHK20-1 KT, Sigma) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La concentración de acetona se determinó mediante cromatografía de gas usando el cromatógrafo de gases 450-GC (Bruker) y el siguiente programa:

- Columna: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- Separación/no separación del inyector: T° = 250 °C
- Horno:

45 

- 80 °C durante 6 minutos
- 10 °C por minuto hasta 220 °C
- 220 °C durante 7 minutos
- Flujo de la columna: 1,5 ml/minuto (Nitrógeno)

- FID del detector: T° = 300 °C

##### *Resultados*

50 La relación [acetona] producida (mM)/[glucosa]consumida (mM) es más alta para la cepa GBE1347 que para la cepa GBE1346.

**EJEMPLO 7: Producción de acetona por las cepas GBE1350 y GBE1351**

*Descripción de la transformación del plásmido en cepas relevantes*

5 La cepa GBE0929 se hizo electrocompetente, y las células GBE0929 electrocompetentes se transformaron con un plásmido denominado pGBE0096. Los transformantes se sembraron después en placas LB suministradas con cloranfenicol (25 ug/ml) y las placas se incubaron durante la noche a 30 °C para obtener la cepa GBE1348.

La cepa GBE1014 se hizo electrocompetente, se transformó con ambos plásmidos pGBE0457 y pGBE0096. Los transformantes se sembraron después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) y cloranfenicol (25 ug/ml) y las placas se incubaron durante la noche a 30 °C para obtener la cepa GBE1349.

10 Las colonias aisladas provenientes de las cepas GBE1348 y GBE1349 se sometieron a identificación sistemática en placas MS que contenían glucosa como la fuente de carbono (2 g/l) y cloranfenicol (25 ug/ml). Estas placas se incubaron 4 días a 30 °C para obtener la cepa GBE1350 y la cepa GBE1351 respectivamente. Las colonias aisladas después se transfieren a medio MS líquido que contenía glucosa (2 g/l) y cloranfenicol (25 ug/ml). Las células GBE1350 y GBE1351 se incubaron a 30 °C.

*Descripción de las condiciones de los matraces*

15 Se inocularon 400 ml de medio MSP que contenía glucosa (10 g/l) y cloranfenicol (25 ug/ml) ya sea con pre-cultivo de la cepa GBE1350 o con pre-cultivo de la cepa GBE1351. La DO<sub>600</sub> inicial era 0,1. Los 400 ml de cultivo se incubaron en frascos de 500 mililitros, sellados con una tapa roscada, a 30 °C, 170 rpm de velocidad. Se tomaron alícuotas de 2 ml después de 1 día, 2 días, 3 días, 6 días, 7 días y 8 días. Para las muestras de cada alícuota, las frascos se abrieron durante 10 segundos.

20 *Descripción de procedimientos analíticos*

Las alícuotas se filtraron y la concentración de glucosa se determinó con el kit de ensayo para glucosa (HK) (GAHK20-1 KT, Sigma) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La concentración de acetona se determinó mediante cromatografía de gas usando el cromatógrafo de gases 450-GC (Bruker) y el siguiente programa:

25 - Columna: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)  
 - Separación/no separación del inyector: T° = 250 °C  
 - Horno:

30     ◦ 80 °C durante 6 minutos  
       ◦ 10 °C por minuto hasta 220 °C  
       ◦ 220 °C durante 7 minutos  
       ◦ Flujo de la columna: 1,5 ml/minuto (Nitrógeno)

- FID del detector: T° = 300 °C

*Resultados*

35 La relación [acetona] producida (mM)/[glucosa] consumida (mM) era más alta para la cepa GBE1351 que para la cepa GBE1350.

TABLA DE RESULTADOS I

	GBE1346	GBE1347	GBE1350	GBE1351	
Captación de glucosa dependiente de PEP ( <i>ptsHI</i> )	+	+	-	-	0,14
Fosfoctolasa heteróloga ( <i>pkt</i> )	-	+	-	+	0,04
EMPP ( <i>pfkAB</i> )	+	-	+	-	
PPP ( <i>zwf edd eda</i> )	+	-	+	-	
Fructosa bisfosfatasa heteróloga ( <i>fbp</i> )	-	-	-	-	
Ruta de acetona heteróloga ( <i>thl ctfAB adc</i> )	+	+	+	+	>0,02
[acetona] <sub>producida</sub> /[glucosa] <sub>consumida</sub>	0,02	>0,02	0,04	0,14	

**EJEMPLO 8: Construcción del plásmido pGBE1020**

5 La finalidad de esta sección es describir la construcción de un plásmido que permita la expresión de la fosfoctolasa YP\_003354041.1 de *Lactococcus lactis* y que permita también la producción de acetona en cepas de *E. coli*.

El gen de fosfoctolasa de *L. lactis* se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pGBE0421 con los cebadores 1516 y 1517 (dados como SEC RC0035 y RC0036, respectivamente).

10 La amplificación mediante PCR permitió insertar un sitio de restricción *EcoRI* y un Sitio de Unión a Ribosoma (RBS) en el extremo 5' y un sitio de restricción *KpnI* en el extremo 3'. El producto de PCR de 2,5 Kpb resultante se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*. El plásmido pGBE0123 se digirió también con las enzimas de restricción, *EcoRI* y *KpnI* y después se ligó con el producto de PCR de 2,5 Kpb. El plásmido resultante (pGBE0928)

se sometió a determinación de secuencia con los cebadores 1061, 1062, 1063, 1064 y 1065 (dados como SEC RC0015, RC0016, RC0017, RC0018 y RC0019, respectivamente).

5 El plásmido pGBE0096 se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *NotI* para crear un producto de 3,6 Kpb. El plásmido pGBE0928 se digirió también con las enzimas de restricción, *KpnI* y *NotI* y se ligó al fragmento de restricción de 3,6 Kpb. El plásmido resultante (pGBE1020) se sometió a determinación de secuencia con los cebadores 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002 y 2003 (dados como SEC RC0037, RC0038, RC0039, RC0040, RC0041, RC0042, RC0043, RC0044, RC0045 y RC0046, respectivamente).

#### **EJEMPLO 9: Construcción del plásmido pGBE1021**

10 La finalidad de esta sección es describir la construcción de un plásmido que permita la producción de acetona en cepas de *E. coli*.

El plásmido pGBE0096 se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *NotI* para crear un producto de 3,6 Kpb.

15 El plásmido pGBE0123 se digirió también con las enzimas de restricción, *KpnI* y *NotI* y después se ligó con el producto de PCR de 3,6 Kpb. El plásmido resultante (pGBE1021) se sometió a determinación de secuencia con los cebadores 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002 y 2003 (dados como SEC RC0037, RC0038, RC0039, RC0040, RC0041, RC0042, RC0043, RC0044, RC0045 y RC0046, respectivamente).

#### **EJEMPLO 10: Producción de acetona por las cepas GBE2264 y GBE2265**

##### *Descripción de la transformación del plásmido en cepas relevantes*

20 La cepa GBE0129 se hizo electrocompetente, y las células GBE0129 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pGB1021. Los transformantes se sembraron después en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C para generar la cepa GBE2262.

La cepa GBE1344 se hizo electrocompetente, y las células GBE1344 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pGBE1020. Los transformantes se sembraron después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C para obtener la cepa GBE2263.

25 Las colonias aisladas provenientes de las cepas GBE2262 y GBE2263 se sometieron a identificación sistemática en placas MS que contenían glucosa como la fuente de carbono (2 g/l) y ampicilina (100 ug/ml). Estas placas se incubaron a 30 °C para obtener las cepas GBE2264 y GBE2265, respectivamente. Después de 4 días de incubación a 30 °C, las colonias se transfirieron a medio MS líquido que contenía glucosa (2 g/l), extracto de levadura (0,1 g/l) y ampicilina (100 ug/ml) y se incubaron 3 días a 30 °C.

##### *Descripción de las condiciones de los matraces*

30 El medio MSP líquido (200 ml) que contenía glucosa (10 g/l), extracto de levadura (0,1 g/l) y ampicilina (100 ug/ml), se inocula ya sea con pre-cultivo de la cepa GBE2264 o con pre-cultivo de la cepa GBE2265. La  $DO_{600}$  inicial era 0,1. Los 200 ml de cultivo se incubaron en frascos de 250 mililitros, sellados con una tapa roscada, a 30 °C, 170 rpm de velocidad. Las alícuotas (2 ml) se tomaron después de 1 día, 2 días, 4 días, 5 días y 6 días. Para la muestra de cada alícuota, el frasco se abrió durante 10 segundos.

##### *Descripción de procedimientos analíticos*

Las alícuotas se filtraron y la concentración de glucosa se determinó mediante análisis de HPLC usando el HPLC Agilent (1260 Infinity) y una columna Hi-Plex (Agilent, PL1170-6830) con una columna de guardia (Agilent, PL Hi-Plex H Guard Column, PL1170-1830).

- 40 - Volumen de inyección: 20 µl
- Composición del disolvente: [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]: 5,5 mM
- Temperatura de las columnas: 65 °C
- RID (G1362A): temperatura ajustada: 35 °C

45 La acetona se extrajo de las alícuotas filtradas mezclando con acetato de metilo (1 volumen de acetato de metilo por 2 volúmenes de alícuota filtrada). La concentración de acetona se determinó mediante cromatografía de gas usando el cromatógrafo de gases 450-GC (Bruker) y el siguiente programa:

- Columna: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- Inyector:
  - Relación de separación: 10
  - T° = 250 °C

- 50 - Horno:

- 50 °C durante 9 minutos
- 20 °C por minuto hasta 180 °C
- 180 °C durante 5 minutos
- Flujo de la columna: 1,5 ml/minuto (Nitrógeno)

5 - FID del detector: T° = 300 °C

#### Resultados

La relación [acetona] producida (mM)/[glucosa] consumida (mM) es más alta para la cepa GBE2265 que para la cepa GBE2264.

#### EJEMPLO 11: Construcción de la cepa GBE1283

10 La cepa GBE0929 se sembró en placas MS que contenían glucosa como la fuente de carbono (2 g/l). Una colonia aislada se transfirió a medio MS líquido que contenía glucosa (2 g/l) y se incubó 3 días a 30 °C. El medio MS líquido (100 ml) que contenía glucosa (2 g/l) se inocula con pre-cultivo de la cepa GBE0929. La DO<sub>600</sub> inicial era 0,1. Los 100 ml de cultivo se incubaron en un Erlenmeyer de 1 l, a 30 °C, 170 rpm de velocidad. Cuando la DO<sub>600</sub> era superior a 1, se tomaba una alícuota del cultivo y se usaba como inóculo para un cultivo nuevo (100 ml de cultivo incubados en Erlenmeyer de 1 l, a 30 °C, 170 rpm de velocidad). La cepa GBE0929 se sub-cultivó 10 veces para obtener la cepa GBE1283.

#### EJEMPLO 12: Construcción de la cepa GBE2256.

20 La cepa GBE1283 se cultivó en medio LB y las células GBE1283 se hicieron electrocompetentes. Las células GBE1283 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pKD46 y después se sembraron en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C. La transformación de las células GBE1283 con el plásmido pKD46 generó la cepa GBE1284.

25 El plásmido pGBE0688 se usó como un molde junto con los cebadores 0629 y 0630 (dados como SEC RC0007 y RC0008, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1,2 Kpb. El producto de PCR de 1,2 Kpb resultante se transformó en bacterias GBE1284 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml). Las placas se incubaron después durante la noche a 37 °C para generar una nueva cepa denominada GBE2252\_pKD46. En la cepa GBE2252\_pKD46 el gen de fosfofructoquinasa *pfkA*, se eliminó y se reemplazó por el casete de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que se producía la supresión del gen *pfkA*, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 0619 y 0620 (dados como SEC RC0009 y RC0010, respectivamente). Este producto de PCR de 1,7 Kpb se sometió a determinación de secuencia con los mismos cebadores 0619 y 0620. Con el fin de confirmar la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE2252\_pKD46 se sembró en placas LB y se incubó durante toda la noche a 42 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirmó sembrando las colonias aisladas en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37 °C y se denominó GBE2252. Las células GBE2252 no crecían en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

35 La cepa GBE2252 se hizo electrocompetente, y las células GBE2252 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pKD46. Las células transformantes se sembraron después en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incubaron durante la noche a 30 °C para obtener una nueva cepa denominada GBE2253.

40 Se generó un producto de PCR usando el plásmido pGBE0687 como un molde y los oligonucleótidos 0631 y 0632 (dados como SEC RC0011 y RC0012, respectivamente) como cebadores. El producto de PCR de 1,3 Kpb resultante se transformó en bacterias GBE2253 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que contenían apramicina (50 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C para generar la cepa GBE2256\_pKD46. En la cepa GBE2256\_pKD46 el gen de fosfofructoquinasa *pfkB*, se elimina y la secuencia de ADN eliminada se reemplazó con un casete que contenía el gen de resistencia a apramicina. Para confirmar que se producía la supresión del gen *pfkB*, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 0621 y 0622 (dados como SEC RC0013 y RC0014, respectivamente). Este producto de PCR final de 2,2 Kpb se sometió a determinación de secuencia usando los mismos cebadores 0621 y 0622.

50 Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE2256\_pKD46 se sembró en placas LB y las placas se incubaron durante la noche a 42 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirmó sembrando las colonias aisladas en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante que crecía en placas LB incubadas a 37 °C se denominó GBE2256. Las células GBE2256 no crecían en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

#### EJEMPLO 13: Construcción de la cepa GBE1518

55 El plásmido pGBE0688 se usó como un molde con los cebadores 0633 y 1109 (dados como SEC RC0003 y RC0047, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1,3 Kpb. Este producto de PCR de 1,3 Kpb se

transformó en bacterias GBE1284 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró después en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C para generar la cepa GBE1433. En la cepa GBE1433 se eliminó la secuencia de ADN constituida por el gen *zwf*. Esta secuencia de ADN eliminada que incluye el gen *zwf* se reemplaza por un casete de resistencia a espectinomicina. Con el fin de confirmar la supresión eficaz del gen *zwf*, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 1036 y 1110 (dados como SEC RC0005 y RC0048, respectivamente). Se obtuvo un producto de PCR final de 1,5 Kpb. Este producto de PCR de 1,5 Kpb se sometió a determinación de secuencia con los mismos cebadores 1036 y 1110.

La cepa GBE1433 se hizo electrocompetente. Las células GBE1433 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pKD46, y después se sembraron en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C. La transformación de las células GBE1433 con el plásmido pKD46 generó la cepa GBE1436.

El plásmido pGBE0687 se usó como un molde junto con los cebadores 0629 y 0630 (dados como SEC RC0007 y RC0008, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1,2 Kpb. El producto de PCR de 1,2 Kpb resultante se transformó en bacterias GBE1436 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que contenían apramicina (50 ug/ml). Las placas se incubaron después durante la noche a 37 °C para generar una nueva cepa denominada GBE1441\_pKD46. En la cepa GBE1441\_pKD46 el gen de fosfofructoquinasa *pfkA*, se eliminó y se reemplazó por el casete de resistencia a apramicina. Para confirmar que se producía la supresión del gen *pfkA*, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 0619 y 0620 (dados como SEC RC0009 y RC0010, respectivamente). Este producto de PCR de 1,7 Kpb se sometió a determinación de secuencia con los mismos cebadores 0619 y 0620. Con el fin de confirmar la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1441\_pKD46 se sembró en placas LB y se incubó durante toda la noche a 42 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se verificó sembrando las colonias aisladas en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37 °C y se denominó GBE1441. Las células GBE1441 no crecían en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

El casete de espectinomicina estaba localizado en los loci correspondientes del gen *zwf* y el casete de apramicina estaba localizado en los loci correspondientes del gen *pfkA*. Con el fin de cortar los casetes resistentes que contenían los genes de resistencia a espectinomicina y apramicina, la cepa GBE1441 se transformó con el plásmido pCP20 para obtener la cepa GBE1441\_p. Después de incubar durante toda la noche en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) a 30 °C, las colonias aisladas se volvieron a sembrar por estrías en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) y se incubaron durante toda la noche a 30 °C. Las colonias aisladas se sembraron después en placas LB y se incubaron durante toda la noche a 42 °C lo cual causa la pérdida del plásmido pCP20. Después, con el fin de confirmar el corte efectivo de los dos casetes resistentes y la pérdida del plásmido pCP20, las colonias aisladas se volvieron a sembrar por estrías en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37 °C, en placas LB que contenían apramicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37 °C, en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C y en placas LB, incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37 °C y se denominó GBE1448. Las células GBE1448 no crecían en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml), en placas LB que contenían apramicina (50 ug/ml), y en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

La cepa GBE1448 se hizo electrocompetente, y las células GBE1448 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pKD46. Las células transformantes se sembraron después en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incubaron durante la noche a 30 °C para obtener una nueva cepa denominada GBE1449. Se genera un producto de PCR usando el plásmido pGBE0688 como un molde y los oligonucleótidos 0631 y 0632 (dados como SEC RC0011 y RC0012, respectivamente) como cebadores. El producto de PCR de 1,3 Kpb resultante se transformó en bacterias GBE1449 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C para generar la cepa GBE1518\_pKD46. En la cepa GBE1518\_pKD46 el gen de fosfofructoquinasa *pfkB*, se eliminó y la secuencia de ADN eliminada se reemplazó con un casete que contenía el gen de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que se producía la supresión del gen *pfkB*, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 0621 y 0622 (dados como SEC RC0013 y RC0014, respectivamente). Este producto de PCR de 2,2 Kpb final se sometió a determinación de secuencia usando los mismos cebadores 0621 y 0622.

Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1518\_pKD46 se sembró en placas LB y las placas se incubaron durante la noche a 42 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirmó sembrando las colonias aisladas en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante que crecía en placas LB incubadas a 37 °C se denominó GBE1518. Las células GBE1518 no crecían en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

#### **EJEMPLO 14: Construcción de la cepa GBE1420**

El plásmido pGBE0688 se usó como un molde con los cebadores 0633 y 0634 (dados como SEC RC0003 y RC0004, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1,3 Kpb. Este producto de PCR de 1,3 Kpb se transformó en bacterias GBE1284 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró después en placas

LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C para generar la cepa GBE1287. En la cepa GBE1287 se eliminó la secuencia de ADN constituida por los genes *zwf*, *edd*, y *eda*. Esta secuencia de ADN eliminada que incluye los genes *zwf*, *edd*, y *eda* se reemplazó con un casete de resistencia a espectinomicina. Con el fin de confirmar la supresión eficaz de los genes *zwf*, *edd*, y *eda*, se realizó una

5  
amplificación con PCR con los cebadores 1036 y 1037 (dados como SEC RC0005 y RC0006, respectivamente). Se obtuvo un producto de PCR final de 1,9 Kpb. Este producto de PCR de 1,9 Kpb se sometió a determinación de secuencia con los mismos cebadores 1036 y 1037.

La cepa GBE1287 se hizo electrocompetente. Las células GBE1287 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pKD46, y después se sembraron en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se

10  
incubaron durante toda la noche a 30 °C. La transformación de las células GBE1287 con el plásmido pKD46 generó la cepa GBE1337.

El plásmido pGBE0687 se usó como un molde junto con los cebadores 0629 y 0630 (dados como SEC RC0007 y RC0008, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1,2 Kpb. El producto de PCR de 1,2 Kpb resultante se transformó en bacterias GBE1337 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que

15  
contenían apramicina (50 ug/ml). Las placas se incubaron después durante la noche a 37 °C para generar una nueva cepa denominada GBE1353\_pKD46. En la cepa GBE1353\_pKD46 el gen de fosfofructoquinasa *pfkA*, se eliminó y se reemplazó por el casete de resistencia a apramicina. Para confirmar que se producía la supresión del gen *pfkA*, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 0619 y 0620 (dados como SEC RC0009 y RC0010, respectivamente). Este producto de PCR de 1,7 Kpb se sometió a determinación de secuencia con los

20  
mismos cebadores 0619 y 0620. Con el fin de confirmar la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1353\_pKD46 se sembró en placas LB y se incubaron durante toda la noche a 42 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se verificó sembrando las colonias aisladas en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37 °C y se denominó GBE1353. Las células GBE1353 no crecían en placas LB suministradas con ampicilina (100

25  
ug/ml).

El casete de espectinomicina estaba localizado en los loci correspondientes de los genes *zwf\_edd\_eda* y el casete de apramicina estaba localizado en los loci correspondientes de los genes *pfkA*. Con el fin de cortar los casetes resistentes que contenían los genes de resistencia a espectinomicina y apramicina, la cepa GBE1353 se transformó con el plásmido pCP20 para obtener la cepa GBE1353\_p. Después de incubar durante toda la noche en placas LB

30  
que contenían ampicilina (100 ug/ml) a 30 °C, las colonias aisladas se volvieron a sembrar por estrías en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) y se incubaron durante toda la noche a 30 °C. Las colonias aisladas se sembraron después en placas LB y se incubaron durante toda la noche a 42 °C lo cual causa la pérdida del plásmido pCP20. Después, con el fin de confirmar el corte efectivo de los dos casetes resistentes y la pérdida del plásmido pCP20, las colonias aisladas se volvieron a sembrar por estrías en placas LB que contenían espectinomicina (50

35  
ug/ml), incubadas durante la noche a 37 °C, en placas LB que contenían apramicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37 °C, en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C y en placas LB, incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37 °C y se denominó GBE1368. Las células GBE1368 no crecían en placas LB que contenían espectinomicina (50 ug/ml), en placas LB que contenían apramicina (50 ug/ml), y en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

La cepa GBE1368 se hizo electrocompetente, y las células GBE1368 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pKD46. Las células transformantes se sembraron después en placas LB que contenían ampicilina (100

40  
ug/ml) y las placas se incubaron durante la noche a 30 °C para obtener una nueva cepa denominada GBE1371. Se genera un producto de PCR usando el plásmido pGBE0688 como un molde y los oligonucleótidos 0631 y 0632 (dados como SEC RC0011 y RC0012, respectivamente) como cebadores. El producto de PCR de 1,3 Kpb resultante se transformó en bacterias GBE1371 electrocompetentes y la mezcla de transformación se sembró en placas LB que

45  
contenían espectinomicina (50 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C para generar la cepa GBE1420\_pKD46. En la cepa GBE1420\_pKD46 el gen de fosfofructoquinasa *pfkB*, se elimina y la secuencia de ADN eliminada se reemplazó con un casete que contenía el gen de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que se producía la supresión del gen *pfkB*, se realizó una amplificación con PCR con los cebadores 0621 y 0622 (dados como SEC RC0013 y RC0014, respectivamente). Este producto de PCR de 2,2 Kpb final se sometió a

50  
determinación de secuencia usando los mismos cebadores 0621 y 0622.

Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1420\_pKD46 se sembró en placas LB y las placas se incubaron durante la noche a 42 °C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirmó sembrando las colonias aisladas en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30 °C, y en placas LB

55  
incubadas durante la noche a 37 °C. La cepa resultante que crecía en placas LB incubadas a 37 °C se denominó GBE1420. Las células GBE1420 no crecían en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

**EJEMPLO 15: Producción de acetona por las cepas GBE2268 y GBE2269***Descripción de la transformación del plásmido en cepas relevantes*

5 La cepa GBE1283 se hizo electrocompetente, y las células GBE1283 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pGB1021. Los transformantes se sembraron después en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incubaron durante la noche a 30 °C para generar la cepa GBE2266.

La cepa GBE1420 se hizo electrocompetente, y las células GBE1420 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pGBE1020. Los transformantes se sembraron después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C para obtener la cepa GBE2267.

10 Las colonias aisladas provenientes de las cepas GBE2266 y GBE2267 se sometieron a identificación sistemática en placas MS que contenían glucosa como la fuente de carbono (2 g/l) y ampicilina (100 ug/ml). Estas placas se incubaron a 30 °C para obtener las cepas GBE2268 y GBE2269 respectivamente. Después de 4 días de incubación a 30 °C, las colonias se transfieren a medio MS líquido que contenía glucosa (2 g/l), extracto de levadura (0,1 g/l) y ampicilina (100 ug/ml) y se incubaron 3 días a 30 °C.

*Descripción de las condiciones de los matraces*

15 Se inoculó medio MSP líquido (200 ml) que contenía glucosa (10 g/l), extracto de levadura (0,1 g/l) y ampicilina (100 ug/ml), ya sea con pre-cultivo de la cepa GBE2268 o con pre-cultivo de la cepa GBE2269. La  $DO_{600}$  inicial era 0,1. Los 200 ml de cultivo se incubaron en frascos de 250 mililitros, sellados con una tapa roscada, a 30 °C, 170 rpm de velocidad. Las alícuotas (2 ml) se tomaron después de 1 día, 2 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días y 8 días. Para la muestra de cada alícuota, el frasco se abrió durante 10 segundos.

*Descripción de procedimientos analíticos*

Las alícuotas se filtraron y la concentración de glucosa se determinó mediante análisis de HPLC usando el HPLC Agilent (1260 Infinity) y una columna Hi-Plex (Agilent, PL1170-6830) con una columna de guardia (Agilent, PL Hi-Plex H Guard Column, PL1170-1830).

- 25
- Volumen de inyección: 20  $\mu$ l
  - Composición del disolvente:  $[H_2SO_4]$ : 5,5 mM
  - Temperatura de las columnas: 65 °C
  - RID (G1362A): temperatura ajustada: 35 °C

30 La acetona se extrajo de las alícuotas filtradas mezclando con acetato de metilo (1 volumen de acetato de metilo por 2 volúmenes de alícuota filtrada). La concentración de acetona se determinó mediante cromatografía de gas usando el cromatógrafo de gases 450-GC (Bruker) y el siguiente programa:

- Columna: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- Inyector:
  - Relación de separación: 10
  - $T^\circ = 250$  °C
- 35 - Horno:
  - 50 °C durante 9 minutos
  - 20 °C por minuto hasta 180 °C
  - 180 °C durante 5 minutos
  - Flujo de la columna: 1,5 ml/minuto (Nitrógeno)
- 40 - FID del detector:  $T^\circ = 300$  °C

*Resultados*

La relación [acetona] producida (mM)/[glucosa] consumida (mM) es más alta para la cepa GBE2269 que para la cepa GBE2268.

**EJEMPLO 16: Producción de acetona por las cepas GBE2272 y GBE2273***Descripción de la transformación del plásmido en cepas relevantes*

La cepa GBE2256 se hizo electrocompetente, y las células GBE2256 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pGB1020. Los transformantes se sembraron después en placas LB que contenían ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incubaron durante la noche a 30 °C para generar la cepa GBE2270.

La cepa GBE1518 se hizo electrocompetente, y las células GBE1518 electrocompetentes se transformaron con el plásmido pGBE1020. Los transformantes se sembraron después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30 °C para obtener la cepa GBE2271.

- 5 Las colonias aisladas provenientes de las cepas GBE2270 y GBE2271 se sometieron a identificación sistemática en placas MS que contenían glucosa como la fuente de carbono (2 g/l) y ampicilina (100 ug/ml). Estas placas se incubaron a 30 °C para obtener las cepas GBE2272 y GBE2273, respectivamente. Después de 4 días de incubación a 30 °C, las colonias se transfirieron a medio MS líquido que contenía glucosa (2 g/l), extracto de levadura (0,1 g/l) y ampicilina (100 ug/ml) y se incubaron 3 días a 30 °C.

*Descripción de las condiciones de los matraces*

- 10 Se inocularon medio MSP líquido (200 ml) que contenía glucosa (10 g/l), extracto de levadura (0,1 g/l) y ampicilina (100 ug/ml), ya sea con pre-cultivo de la cepa GBE2272 o con pre-cultivo de la cepa GBE2273. La  $DO_{600}$  inicial era 0,1. Los 200 ml de cultivo se incubaron en frascos de 250 mililitros, sellados con una tapa roscada, a 30 °C, 170 rpm de velocidad. Las alícuotas (2 ml) se toman después de 1 día, 2 días, 4 días, 5 días y 6 días. Para la muestra de cada alícuota, el frasco se abrió durante 10 segundos.

15 *Descripción de procedimientos analíticos*

Se filtraron las alícuotas y la concentración de glucosa se determinó mediante análisis de HPLC usando el HPLC Agilent (1260 Infinity) y una columna Hi-Plex (Agilent, PL1170-6830) con una columna de guardia (Agilent, PL Hi-Plex H Guard Column, PL1170-1830).

- 20 - Volumen de inyección: 20  $\mu$ l  
 - Composición del disolvente:  $[H_2SO_4]$ : 5,5 mM  
 - Temperatura de las columnas: 65 °C  
 - RID (G1362A): temperatura ajustada: 35 °C

- 25 La acetona se extrajo de las alícuotas filtradas mezclando con acetato de metilo (1 volumen de acetato de metilo por 2 volúmenes de alícuota filtrada). La concentración de acetona se determinó mediante cromatografía de gas usando el cromatógrafo de gases 450-GC (Bruker) y el siguiente programa:

- Columna: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)  
 - Inyector:  
     ◦ Relación de separación: 10  
     ◦  $T^\circ = 250$  °C
- 30 - Horno:  
     ◦ 50 °C durante 9 minutos  
     ◦ 20 °C por minuto hasta 180 °C  
     ◦ 180 °C durante 5 minutos  
     ◦ Flujo de la columna: 1,5 ml/minuto (Nitrógeno)
- 35 - FID del detector:  $T^\circ = 300$  °C

*Resultados*

La relación [acetona] producida (mM)/[glucosa] consumida (mM) es más alta para la cepa GBE2273 que para la cepa GBE2272.

TABLA DE RESULTADOS II

	GBE2264	GBE2265	GBE2268	GBE2269	GBE2268	GBE2273	GBE2272	GBE2273
captación de glucosa dependiente de PEP ( <i>ptsHf</i> )	+	+	-	+	-	-	-	-
Fosfoacetolasa heteróloga ( <i>pktI</i> )	-	+	-	+	-	+	+	+
EMPP ( <i>pfkAB</i> )	+	-	+	-	+	-	-	-
PPP ( <i>zwf</i> )	+	-	+	-	+	-	+	-
EDP ( <i>edd eda</i> )	+	-	+	-	+	+	+	+
Ruta de acetona heteróloga ( <i>thf ctAB adc</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+
[acetona] <sub>producida</sub> / [glucosa] <sub>consumida</sub> (mM) la relación reportada es la máxima observada	0,03	0,21	0,01	0,22	0,01	0,51	0,05	0,51

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Scientist of Fortune S.A. y col.

5 <120> Microorganismo recombinante para la producción de metabolitos útiles

<130> T1761 PCT S3

10 <150> EP 11 17 3563.5  
<151> 12-07-2011

<160> 54

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 134  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Secuencia de nucleótido

25 <400> 1

<b>aggctagact ttagttccac aacactaaac ctataagttg gggaaataca gtgtaggctg</b>	<b>60</b>
<b>gagctgcttc gaagttccta tactttctag agaataggaa cttcggaata ggaactaagg</b>	<b>120</b>
<b>aggatattca tatg</b>	<b>134</b>

30 <210> 2  
<211> 1205  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia de nucleótido

<400> 2

ES 2 554 814 T3

```

agagcggccg ccaccgcggg aagttcctat actttctaga gaataggaac ttcagctgat      60
agaaacagaa gccactggag cacctcaaaa acaccatcat acactaaatc agtaagttgg      120
cagcatcacc cgacgcactt tgcgccgaat aaatacctgt gacggaagat cacttcgcag      180
aataaataaa tcttgggtgc cctggtgata ccggaagcc ctgggccaac ttttggcgaa      240
aatgagacgt tgatcggcac gtaagaggtt ccaactttca ccataatgaa ataagatcac      300
taccgggctt attttttgag ttatcgagat tttcaggagc taaggaagct acatagagt      360
gaaaaagtgc ccgccgagat ttcggtgcaa ctatcacaag cactcaacgt catcgggctc      420
cacttggagt cgacgttgcg ggccgtgcat ttgtacggct ccgcaactga tggcggattg      480
aaaccgtaca gtgatattga tttgctggtg actgtagctg caccgctcaa tgatgccgtg      540
cggcaagccc tgctcgtoga tctcttgag gtttcagctt ccctggcca aaacaaggca      600
ctccgcgcct tggaagtgc catcgtcgtg cacagtgaca tcgtacctg gcgttatccg      660
gccaggcggg aactgcagtt cggagagtgg cagcgcaaag acatccttgc gggcatcttc      720

gagcccgcca caaccgattc tgacttggcg attctgctaa caaaggcaa gcaacatagc      780
gtcgtcttgg caggttcagc agcgaaggat ctcttcagct cagtcccaga aagcgtacta      840
ttcaaggcac tggccgatac tctgaagcta tggaaactgc ccgcaagattg ggcgggctgat      900
gagcggaatg tagtgcttac tttgtctcgt atctggtaca ccgcagcaac cggcaagatc      960
gcgccaaagg atgttgctgc cacttgggca atggcacgct tgccagctca acatcagccc     1020
atcctgttga atgccaagcg ggcttatctt gggcaagaag aagattattt gcccgctcgt     1080
gcggatcagg tggcggcgtc cattaaattc gtgaagtatg aagcagtaa actgcttggc     1140
gccagccaat aagaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcgcat gcacgcagca     1200
tatgc                                             1205

```

<210> 3  
 <211> 1129  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

10

<400> 3

ES 2 554 814 T3

agagcggccg ccaccgcggg aagttcctat actttctaga gaataggaac ttcgggttca 60  
 tgtgcagctc catcagcaaa aggggatgat aagtttatca ccaccgacta tttgcaacag 120  
 tgccgttgat cgtgctatga tgcactgatg tcatcagcgg tggagtgcaa tgcctgtaa 180  
 tacgaatggc gaaaagccga gctcatcggg cagcttctca accttggggg taccocgggc 240  
 ggtgtgctgc tgggccacag ctccctccgt agcgtccggc ccctcgaaga tgggccactt 300  
 ggactgatcg aggccctgcg tgetgcgctg ggtccgggag ggacgctcgt catgccctcg 360  
 tggtcaggtc tggacgacga gccgttcgat cctgccacgt cgcctgtac accggacctt 420  
 ggagttgtct ctgacacatt ctggcgctg ccaaagttaa agcgcagcgc ccatccattt 480  
 gcctttgctg cagcggggcc acaggcagag cagatcatct ctgatccatt gccocctgcca 540  
 cctcactcgc ctgcaagccc ggtcgcccggt gtccatgaac tcgatgggca ggtacttctc 600  
 ctcgccgtgg gacacgatgc caacacgacg ctgcatcttg ccgagttgat ggcaaagggt 660  
 ccctatgggg tggcgagaca ctgcaccatt cttcaggatg gcaagttggt acgcgtcgat 720  
 tatctcgaga atgaccactg ctgtgagcgc tttgccttgg cggacaggtg gctcaaggag 780  
 aagagccttc agaaggaagg tccagtcggt catgcctttg ctcggttgat ccgctcccgc 840  
 gacattgtgg cgacagccct gggtaactg ggccgagatc cgttgatctt cctgcatccg 900  
 ccagaggcgg gatgcgaaga atgcgatgcc gctcgccagt cgattggctg agctcatgag 960  
 cggagaacga gatgacgctg gaggggcaag gtcgcgctga ttgctggggc aacacgtgga 1020  
 ggggatcggg gattgtcttt cttcagctcg ctgatgatat gctgacgctc aatgccgaag 1080  
 ttctataact ttctagagaa taggaacttc gcatgcacgc agcatatgc 1129

5 <210> 4  
 <211> 99  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido  
 <400> 4

aagcttgccg ccgogggggt aattaacctc cttagttaa acctaggcat gcctctagag 60  
 gatccccggg taccgagctc gaattacctg caggaattc 99

15 <210> 5  
 <211> 2508  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido  
 <400> 5

ES 2 554 814 T3

ttaattaatg catcatcacc accatcacat gaccgaatat aacagcgaag cctatctgaa	60
aaaactggat aaatgggtggc gtgcagcaac ctatctgggt gcaggtatga tttttctgaa	120
agaaaatccg ctgttttagcg ttaccggcac cccgattaaa gcagaaaatc tgaaagccaa	180
tccgattggt cattggggca ccgttagcgg tcagaccttt ctgtatgcac atgcaaatcg	240
cctgattaac aaatataacc agaaaatggt ttatatgggt ggtccgggtc atgggtggta	300
ggcaatgggt gttccgagct atctggatgg tagctatacc gaagcatatc cggaaattac	360
ccaggatctg gaaggtatga gccgtctggt taaacgtttt agctttccgg gtgggtattgg	420
tagccacatg accgcacaga caccgggtag cctgcatgaa ggtggtgaac tgggttatgt	480
tctgagccat gcaaccgggt caattctgga tcagccgga caaattgcat ttgcagttgt	540
tggatgatgg gaagcagaaa ccggtccgct gatgaccagc tggcatagca tcaaatttat	600
caaccgaaa aacgatgggt ccattctgcc gattctggat ctgaatggct ttaaaatcag	660
caatccgacc ctgtttgcac gtaccagtga tgttgatata cgcaaatttt tcgaaggctc	720
gggttatagt ccgctttata ttgaaaacga tgacatccat gactacatgg cctatcataa	780
actggcagca gaagtttttg acaaagccat tgaagatata catcagattc agaaagatgc	840
ccgtgaagat aatcgctatc agaatggtga aattccggca tggccgattg ttattgcacg	900
tctgccgaaa ggttgggggtg gtccctcgta taatgattgg agcgggtccga aatttgatgg	960
taaaggtatg ccgatcgaac atagctttcg tgcacatcag gttccgctgc cgctgagcag	1020
caaaaacatg ggcaccctgc cggaatttgt taaatggatg accagctatc agccggaaac	1080
cctgtttaat gcagatggta gcctgaaaga agaactgccc gattttgcac cgaaaggtga	1140
aatgcgtatg gcaagcaatc cggttaccaa tgggtgggtgt gattatagca atctggttct	1200

ES 2 554 814 T3

gccggattgg caagaatttg caaatccgat tagogaaaac aatcgtggta aactgctgcc 1260  
 ggataccaat gataatatgg atatgaacgt gctgagcaaa tatttcgccg aaattgtaa 1320  
 actgaaccog acccgttttc gtctgtttgg tccggatgaa accatgagca atcgtttttg 1380  
 ggagatgttt aaagtgacca atcgtcagtg gatgcagggt atcaaaaatc cgaacgatga 1440  
 gtttattagt ccggaaggtc gcattattga tagccagctg agcgaacatc aggcagaagg 1500  
 ttggctggaa ggttatacc tgaccggtcg taccgggtgt tttgcaagct atgaaagttt 1560  
 tctgcgtgtt gttgatagca tgctgacca gcaactttaa tggattcgtc aggcagcaga 1620  
 tcagaaatgg cgtcatgatt atccgagcct gaatgttatt agcaccagca ccgtttttca 1680  
 gcaggatcat aatggttata cccatcaaga tccgggtatg ctgaccatc tggcagagaa 1740  
 aaaaagcgt tttattcgtc agtatctgcc tgcagatggt aataccctgc tggccgtttt 1800  
 tgatcgtgca tttcaggatc gcagcaaaaat taaccatatt gttgcaagca aacagcctcg 1860  
 tcagcagtgg tttaccaaag aagaagcaga aaaactggcc accgatggta ttgcaacat 1920  
 tgattgggca agcaccgcaa aagatggtga agccgttgat ctggtttttg caagtgccgg 1980  
 tgcagaaccg accattgaaa ccctggcagc actgcatctg gttaatgaag tttttccgca 2040  
 ggccaaattt cgctatgta atgttgttga actgggtcgt ctgcagaaaa agaaaggtgc 2100  
 actgaatcaa gaacgcgaac tgagtgatga agagttcgaa aaatactttg gtccgagcgg 2160  
 tacaccggtt atttttgggt ttcattggcta tgaagatctg atcgagagca tcttttatca 2220  
 gcgtggtcat gatggtctga ttgttcatgg ttatcgtgaa gatggtgata ttaccaccac 2280  
 ctatgatatg cgtgtttata gcgaactgga tcgttttcat caggcaattg atgcaatgca 2340  
 ggttctgtat gtgaatcgta aagttaatca gggctctggcc aaagcattta ttgatcgtat 2400  
 ggaacgtacc ctggtgaaac attttgaagt taccogtaat gaaggcgttg atattccgga 2460  
 atttaccgaa tgggtttgga gcgatctgaa aaagtaatga gcggccgc 2508

5 <210> 6  
 <211> 86  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido  
 <400> 6

gaattcgagc tccgtaccgg gggatcctct agaggcatgc ctaggtttaa actaaggagg 60  
 ttaattaacc ccgcccgcgc aagctt 86

15 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

# ES 2 554 814 T3

	<400> 7		
	ggttcaattc ttccttagc ggc	23	
5	<210> 8 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Secuencia de nucleótido		
	<400> 8		
	ccgcaaaaac gacatccggc acg	23	
15	<210> 9 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Secuencia de nucleótido		
	<400> 9		
	<b>caagtatacc ctggcttaag taccgggta gttaacttaa ggagaatgac agagcggccg</b>		<b>60</b>
25	<b>ccaccgcggg</b>		<b>70</b>
	<210> 10 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Secuencia de nucleótido		
35	<400> 10		
	<b>gcaaaaaaac gctacaaaaa tgcccgatcc tcgatcgggc attttgactt gcatatgctg</b>		<b>60</b>
	<b>cgtgcatgcg</b>		<b>70</b>
40	<210> 11 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Secuencia de nucleótido		
	<400> 11		
	ccgcactttg cgcgctttc cc	22	
50	<210> 12 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> Secuencia de nucleótido		
	<400> 12		
	ggtgatttc agtgagtct cccc	24	
60	<210> 13		

ES 2 554 814 T3

<211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 13  
**agacttccgg caacagattt cattttgcat tccaaagttc agaggtagtc agagcggccg** 60  
**ccaccgcggg** 70

10

<210> 14  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

20

<400> 14  
**gcttctgtca tcggtttcag ggtaaaggaa tctgcctttt tccgaaatca gcatatgctg** 60  
**cgtgcatgcg** 70

25

<210> 15  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 15  
 ggcgctcacg atcttcgac gcggc 25

35

<210> 16  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 16  
 ccgcctcata ttgctgacaa agtgcg 27

45

<210> 17  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 17

55

**actttccgct gattcgggtgc cagactgaaa tcagcctata ggaggaaatg agagcggccg** 60  
**ccaccgcggg** 70

<210> 18

ES 2 554 814 T3

<211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 18

**gttgccgaca ggttggtgat gattcccca atgctggggg aatgtttttg gcatatgctg** **60**

**cgatgcatgcg** **70**

10

<210> 19  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

20

<400> 19  
 ccacagcgac caggcagtg tggtgcc 27

<210> 20  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

30

<400> 20  
 gcactttggg taagccccga aacc 24

35

<210> 21  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 21  
 ccattcaggc tgcgcaactg 20

45

<210> 22  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 22  
 ggcggtggc cgattcatta atgc 24

55

<210> 23  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 23  
 caatccgacc ctgtttgcac gtac 24

5 <210> 24  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 24  
 gctgccggat accaatgata atatgg 26

15 <210> 25  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 25  
 ccatattatc attggtatcc ggcagc 26

25 <210> 26  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 26  
 cccgggggat ccagaatta aaaggaggga tt 32

35 <210> 27  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 27  
 ctcgaggata tcaagaattc ttttaaaca gccatgggc 40

45 <210> 28  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 28  
 tgtaaaacga cggccagt 18

55 <210> 29  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

65 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 29  
 caggaaacag ctatgacc 18

5 <210> 30  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 30  
 ctcgaggata tcaggaaggt gactttatg ttaaagg 37

15 <210> 31  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

25 <400> 31  
 gcatgctg acattaaaa aataagagtt acc 33

30 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 32  
 cctcacggca aagttcaag c 21

40 <210> 33  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 33  
 gccatgggtc taagttcatt gg 22

50 <210> 34  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 34  
 catgattta aggggggtac catatgcata agttaa 37

60 <210> 35  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

	<400> 35 gttattttta aggatccttt ttagcacttt tctagc	36
5	<210> 36 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de nucleótido	
	<400> 36 ggcagaaagg gagaaactgt ag	22
15	<210> 37 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia de nucleótido	
25	<400> 37 tggaaagaat acgtgcaggc gg	22
30	<210> 38 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencia de nucleótido	
	<400> 38 gattacgccca agcttgcattg cc	22
40	<210> 39 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Secuencia de nucleótido	
	<400> 39 ccggcctcat ctacaatact acc	23
50	<210> 40 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Secuencia de nucleótido	
	<400> 40 cccattattg ctgggtcaac tcc	23
60	<210> 41 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Secuencia de nucleótido	

<400> 41  
 cccggtacct cactactttt tcagatcgct ccaaacc 38

5 <210> 42  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 42  
 ggggaatca ggagggtgac tagatgcatc atcaccacca tcatatgacc 50

15 <210> 43  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

25 <400> 43  
 ccatagctcc acccatacca gagagc 26

30 <210> 44  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

35 <400> 44  
 gctattatta cgtcagcatc tcctgc 26

40 <210> 45  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

45 <400> 45  
 gcaggcgaag ttaatggcgt gc 22

50 <210> 46  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

55 <400> 46  
 gatacggggt aacagataaa ccatttc 27

60 <210> 47  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótido

	<400> 47 cccttctgc cttaattac tacagg	26
5	<210> 48 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de nucleótido	
	<400> 48 gcatcaggat taaatgactg tgcagc	26
15	<210> 49 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia de nucleótido	
	<400> 49 ggactagcgc ccattccaac tattcc	26
25	<210> 50 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia de nucleótido	
	<400> 50 gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcc	29
40	<210> 51 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de nucleótido	
45	<400> 51 gcattgcgtg tacaagagta acgag	25
50	<210> 52 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de nucleótido	
55	<400> 52 cctgtccaag ctcatgtac gg	22
60	<210> 53 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Secuencia de nucleótido	

ES 2 554 814 T3

<400> 53

**gogcaagatc atgttaccgg taaaataacc ataaaggata agcgcagata gcatatgctg 60**

**cgtgcatgcg 70**

5 <210> 54  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia de nucleótido

<400> 54  
15 cgctgtaac cggagctcat aggg 24

**REIVINDICACIONES**

1. Un microorganismo recombinante **caracterizado porque**:
  - a) tiene actividad de fosfocetolasa;
  - 5 b) (i) tiene una ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifica(n) fosfofructoquinasa o por estar modificado genéticamente para reducir la actividad de fosfofructoquinasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente; o (ii) no posee actividad de fosfofructoquinasa;
  - y
  - 10 c) (i) tiene una rama oxidativa disminuida o inactivada de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifica(n) glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o por estar modificado genéticamente para reducir la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente; o (ii) no posee actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
2. El microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado también porque**:
  - 15 d) tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa.
3. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1 o 2, en el que la EMPP está disminuida o inactivada adicionalmente por inactivación del gen o genes que codifica(n) gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa o por estar modificado genéticamente para reducir la actividad de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente.
- 20 4. El microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que se ha modificado genéticamente para que tenga una actividad de fosfocetolasa incrementada.
5. El microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en las que dicho microorganismo es un hongo.
6. El microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en las que dicho microorganismo es una bacteria.
- 25 7. El microorganismo recombinante de la reivindicación 6, en el que el gen o genes que codifica(n) para el transportador de PTS dependiente de PEP se ha/han inactivado.
8. El microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado también porque** éste:
  - 30 e) es capaz de convertir acetil-CoA en acetona.
9. El microorganismo recombinante de la reivindicación 8, **caracterizado también porque** éste:
  - f) es capaz de convertir acetona en isobuteno.
10. El microorganismo recombinante de la reivindicación 8, **caracterizado también porque** éste:
  - g) es capaz de convertir acetona en propeno.
- 35 11. Uso del microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la conversión de glucosa en acetil-CoA.
12. Uso del microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para la conversión de glucosa en acetona.
13. Uso del microorganismo recombinante de la reivindicación 9 para la conversión de glucosa en isobuteno.
- 40 14. Uso del microorganismo recombinante de la reivindicación 10 para la conversión de glucosa en propeno.
15. Un procedimiento de producción de acetona a partir de glucosa que comprende las etapas de:
  - cultivar el microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en un medio apropiado; y
  - opcionalmente recuperar dicha acetona a partir del medio de cultivo.
16. Un procedimiento de producción de isobuteno a partir de glucosa que comprende las etapas de:
  - 45 cultivar el microorganismo de acuerdo con la reivindicación 9 en un medio apropiado; y
  - opcionalmente recuperar dicho isobuteno.

17. Un procedimiento de producción de propeno a partir de glucosa que comprende las etapas de:
- cultivar el microorganismo de acuerdo con la reivindicación 10 en un medio apropiado; y
  - opcionalmente recuperar dicho propeno.

**FIGURA 1**

**Esquema 1.** Producción de acetil-CoA a partir de glucosa-6-fosfato a través de la ruta de fosfocetolasa, Caso representativo 1

- 1a.) 2 D-glucosa-6-fosfato = 2 D-fructosa-6-fosfato (EC 5.3.1.9)
  - 1b.) D-fructosa-6-fosfato + fosfato = fosfato de acetilo + D-eritrosa-4-fosfato + H<sub>2</sub>O (EC 4.1.2.22)
  - 1c.) D-eritrosa-4-fosfato + D-fructosa-6-fosfato = sedoheptulosa-7-fosfato + D-gliceraldehído-3-fosfato (EC 2.2.1.2)
  - 1d.) Sedoheptulosa-7-fosfato + D-gliceraldehído-3-fosfato = D-ribosa-5-fosfato + D-xilulosa-5-fosfato (EC 2.21.1)
  - 1e.) D-ribosa-5-fosfato = D-ribulosa-5-fosfato (EC 5.3.1.6)
  - 1f.) D-ribulosa-5-fosfato = D-xilulosa-5-fosfato (EC 5.1.3.1)
  - 1g.) 2 D-xilulosa-5-fosfato + 2 fosfato = 2 fosfato de acetilo + 2 D-gliceraldehído-3-fosfato + 2 H<sub>2</sub>O (EC 4.1.2.22 y/o EC 4.1.2.9)
  - 1h.) 3 fosfato de acetilo + 3 CoA = 3 acetil-CoA + 3 fosfato (EC 2.3.1.8)
- 
- 1.) 2 D-glucosa-6-fosfato + 3 CoA = 3 acetil-CoA + 2 D-gliceraldehído-3-fosfato + 3 H<sub>2</sub>O

**Esquema 2.** Producción de acetil-CoA a partir de glucosa-6-fosfato a través de la ruta de fosfocetolasa, Caso representativo 2

- 2a.) 2 D-glucosa-6-fosfato = 2 D-fructosa-6-fosfato (EC 5.3.1.9)
- 2b.) D-fructosa-6-fosfato + D-gliceraldehído-3-fosfato = D-xilulosa-5-fosfato + D-eritrosa-4-fosfato (EC 2.2.1.1)
- 2c.) D-eritrosa-4-fosfato + D-fructosa-6-fosfato = sedoheptulosa-7-fosfato + D-gliceraldehído-3-fosfato (EC 2.2.1.2)
- 2d.) Sedoheptulosa-7-fosfato + D-gliceraldehído-3-fosfato = D-ribosa-5-fosfato + D-xilulosa-5-fosfato (EC 2.2.1.1)
- 2e.) D-ribosa-5-fosfato = D-ribulosa-5-fosfato (EC 5.3.1.6)
- 2f.) D-ribulosa-5-fosfato = D-xilulosa-5-fosfato (EC 5.1.3.1)
- 2g.) 3 D-xilulosa-5-fosfato + 3 fosfato = 3 fosfato de acetilo + 3 D-gliceraldehído-3-fosfato + 3 H<sub>2</sub>O (EC 4.1.2.9 y/o EC 4.1.2.22)

2h.) 3 fosfato de acetilo + 3 CoA = 3 acetil-CoA + 3 fosfato (EC 2.3.1.8)

---

2.) 2 D-glucosa-6-fosfato + 3 CoA = 3 acetil-CoA + 2 D-gliceraldehído-3-fosfato + 3 H<sub>2</sub>O